



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**CHARAKTERIZACE ÚČINNOSTI IZOLAČNÍCH  
POSTUPŮ VONNÝCH LÁTEK Z ROSTLIN**

CHARACTERIZATION OF EFFICIENCY OF ISOLATION PROCEDURES FOR FRAGRANCES  
FROM PLANTS

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Bc. Markéta Stávková

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

prof. Ing. Josef Čáslavský, CSc.

BRNO 2017

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1018/2016  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: Bc. Markéta Stávková  
Studijní program: Spotřební chemie  
Studijní obor: Spotřební chemie  
Vedoucí práce: prof. Ing. Josef Čáslavský, CSc.  
Akademický rok: 2016/17

### Název diplomové práce:

Charakterizace účinnosti izolačních postupů vonných látek z rostlin

### Zadání diplomové práce:

1. Vypracování literární rešerše zaměřené na postupy izolace vonných látek z přírodních materiálů.
2. Na základě výsledků literární rešerše a s přihlédnutím k vybavení laboratoří ÚCHTOŽP vyberte optimální metodu izolace.
3. Pomocí optimálního postupu izolujte vonné látky z vybraných přírodních materiálů.
4. Pomocí separačních technik ve spojení s hmotnostní spektrometrií charakterizujte složení získaných směsí.

### Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Markéta Stávková  
student(ka)

-----  
prof. Ing. Josef Čáslavský, CSc.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce je zaměřena na izolaci vonných látek přírodního původu destilací vodní parou, ultrazvukovou extrakcí, mikrovlnnou extrakcí a tlakovou extrakcí rozpouštědlem. Získané extrakty byly charakterizovány pomocí GCxGC/TOF-MS. Ke studiu povrchové struktury listu pomocí SEM, byl zvolen vzorek listu meduňky lékařské. Snímky byly pořízeny před a po extrakčním procesu.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

vonné látky, GC-FID, GC/MS, GCxGC/TOF-MS, SEM, rostliny

## **ABSTRACT**

The diploma thesis will be focuses on the isolation of fragrances of natural origin by steam vapor distillation, ultrasonic extraction, microwave extraction and pressure solvent extraction. The extracts were characterized by GCxGC/TOF-MS. To study the surface structure of the leaf by SEM, a sample of the medulla medical was selected. Photos were taken before and after extraction.

## **KEYWORDS**

fragrances, GC-FID, GC/MS, GCxGC/TOF-MS, SEM, plants

STÁVKOVÁ, M. *Charakterizace účinnosti izolačních postupů vonných látek z rostlin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 82 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Josef Čáslavský, CSc.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma Charakterizace účinnosti izolačních postupů vonných látek z rostlin jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu použitých zdrojů na konci práce.

V Brně dne .....

.....

(podpis autora)

## PODĚKOVÁNÍ

*Na tomto místě bych ráda poděkovala rodině za její podporu, trpělivost a pochopení. Děkuji vedoucímu diplomové práce prof. Ing. Josefu Čáslavskému, CSc. za odborné vedení práce, za čas, který mi věnoval, poskytnuté informace a ochotu. V neposlední řadě děkuji Ing. Leošovi Doskočilovi, Ph.D. a firmě Botanicus spol. s r.o. za poskytnuté vzorky.*

# OBSAH

<b>1 Úvod</b>	<b>8</b>
<b>2 Teoretická část</b>	<b>9</b>
2.1 Rostlin .....	9
2.1.1 Morfologie rostlin .....	9
2.1.2 Anatomie rostlin .....	11
2.2 Charakteristika sledovaných rostlin .....	13
2.2.1 Heřmánek pravý ( <i>Matricaria chamomilla</i> ) .....	13
2.2.2 Levandule lékařská ( <i>Lavandula angustifolia</i> ) .....	14
2.2.3 Máta kadeřavá ( <i>Mentha spicata</i> ) .....	15
2.2.4 Meduňka lékařská ( <i>Melissa officinalis</i> ) .....	16
2.2.5 Šalvěj lékařská ( <i>Salvia officinalis</i> ) .....	17
2.3 Vonné látky rostlinného původu .....	18
2.3.1 Biosyntetické postupy vzniku vonných látek .....	21
2.4 Metody získávání přírodních vonných látek .....	22
2.4.1 Destilace vodní parou .....	23
2.4.2 Extrakce .....	23
2.4.3 Lisování za studena .....	26
2.5 Rozpouštědla .....	27
2.5.1 Voda, nevodná a směsná rozpouštědla .....	27
2.5.2 Iontové kapaliny .....	28
2.5.3 Intermolekulární síly .....	29
2.6 Analytické metody .....	30
2.6.1 Plynová chromatografie (GC) .....	30
2.6.2 Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC/MS) .....	33
2.6.3 Kompletní dvojrozměrná plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GCxGC/TOF-MS) .....	35
2.7 Charakteristika esenciálních olejů .....	36
2.7.1 Heřmánkový olej .....	36
2.7.2 Máťový olej .....	37
2.7.3 Meduňkový olej .....	37

2.7.4	Levandulový olej.....	37
2.7.5	Šalvějový olej.....	38
2.8	Mikroskopické metody.....	39
2.8.1	Optická mikroskopie .....	39
2.8.2	Elektronová mikroskopie .....	30
<b>3</b>	<b>Experimentální část</b>	<b>42</b>
3.1	Vzorky rostlinného materiálu.....	42
3.1.1	Sběr, úprava rostlin před použitím .....	42
3.2	Chemikálie, laboratorní vybavení, zařízení a přístroje .....	42
3.2.1	Chemikálie .....	42
3.2.2	Laboratorní vybavení .....	43
3.2.3	Laboratorní zařízení, přístroje, software .....	44
3.3	Pracovní postupy, podmínky separačních metod.....	44
3.3.1	Destilace vodní parou (DvP) .....	44
3.3.2	Ultrazvuková extrakce (UE).....	44
3.3.3	Mikrovlnná extrakce (MAE).....	45
3.3.4	Extrakce podporovaná tlakem (PSE) .....	46
3.4	Podmínky analytických metod.....	47
3.4.1	GC-FID.....	47
3.4.2	GC/MS .....	48
3.4.3	GCxGC/TOF-MS .....	48
3.5	Podmínky mikroskopických metod.....	49
3.5.1	SEM.....	49
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuze</b>	<b>50</b>
4.1	Identifikace a kvantifikace vonných látek metodou GCxGC/TOF-MS..	50
4.1.1	Porovnání počtu identifikovaných chemických sloučenin ve vzorcích .....	64
4.1.2	Porovnání obsahu terpenů vonných látek v extraktech .....	64
4.2	Porovnání chromatogramů extrakčních metod s použitím IL .....	66
4.3	Hmotnostní spektra významných vonných látek ze získaných extraktů.....	69
4.4	Povrchová analýza.....	71
<b>5</b>	<b>Závěr</b>	<b>75</b>

<b>6</b>	<b>Seznam použitých zdrojů</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použitých zkratk</b>	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>Seznam příloh</b>	<b>82</b>

# 1 ÚVOD

Během staletí se objevily a stále se objevují rostliny s vonnými látkami, které se staly běžnou součástí našeho každodenního života. Silice, tzv. sekundární metabolity rostlin obsahují až tisíce chemických sloučenin, některé z nich jsou dnes významnou součástí terapeutických prostředků a řady léčiv. Jejich účinky mají široký záběr, který není zcela prozkoumaný.

Zprávy o tom, jak izolovat vonné látky z rostlin se objevují již ve 4. tisíciletí před naším letopočtem, od té doby se separační postupy značně rozvinuly. Snahou dnešních analytických a organických chemiků i biochemiků je zdokonalování moderních analytických metod, nalézání efektivnějších způsobů izolace vonných látek a studium biosyntetických postupů vzniku vonných látek při co největší šetrnosti k životnímu prostředí. Při izolaci vonných látek z rostlin se výzkum zaměřuje na různé druhy extrakce, při kterých se používají šetrná organická činidla, s krátkou dobou extrakce a soustředí se na maximalizaci zisku. Dochází k využití ultrazvukových vln (ultrazvuková extrakce), mikrovln (mikrovlnná extrakce) za použití nebo bez použití rozpouštědla [20].

Naším cílem je zaměřit se na postupy izolace vonných látek přírodního původu pomocí metody optimalizované pro podmínky laboratoří ÚCHTOŽP. Získané extrakty dále charakterizovat pomocí separačních postupů ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Vypracovat přehled o stanovení vonných látek v jednotlivých extraktech. V závěru provést porovnání anatomických částí rostlinného materiálu pomocí transmisní elektronové mikroskopie za účelem sledování změny povrchové struktury a pochopení extrakčního mechanismu během různých extrakčních technik.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Rostliny

Rostliny představují otevřené dynamické, vysoce uspořádané struktury se stálou výměnou molekul, atomů a iontů. Jsou vybaveny orgány a nižšími strukturními jednotkami, jako dílčími systémy, tzv. subsystémy. Přijímají z prostředí energii a různé látky, které také do prostředí vylučují. Kromě produkce kyslíku mají také schopnost absorbovat škodlivé látky ze vzduchu. Některé rostliny mohou být využity jako tzv. bioindikátory. Například výskyt parožnatek signalizuje oligotrofní vody. Rostliny využívají fyzikální vlastnosti prostředí, v němž vegetují (teplotu, proudění plynů, vlhkost, pevnost substrátu aj.) a registrují změny vnějších faktorů. Rostou tehdy, jsou-li splněny určité požadavky, především dostatek světla, vlhkosti a je-li vhodná okolní teplota. Různé rostliny mají různé potřeby. Některé reagují na délku dne, některé rostou pouze po dešti, např. stromy, které vyraší listy, až když je dosažena určitá teplota vzduchu. Nejsou-li splněny základní podmínky, může nastat pro rostlinu období vegetačního klidu nebo její odumření. Úžasnou různorodost pletiv a orgánů v jednotlivých rostlinách způsobuje dělení buněk (mitóza), růst buněk a diferenciaci buněk. Dochází tedy ke vzniku rozmanitých rodů a druhů rostlin [1],[4],[9].

Značnou část rostliny tvoří voda, 60 – 95 % se nachází v čerstvých listech, 5 – 15 % v semenech. Nejvíce vody obsahují plody a zásobní orgány a nejméně semena. Voda je v rostlině prostředím pro metabolické procesy, zdrojem elektronů a protonů při fotosyntéze, zdrojem kyslíku uvolňovaného do ovzduší. Napomáhá transportu minerálních a organických látek, reguluje teplotu a udržuje tvar nezdřevnatělých částí rostliny [5].

#### 2.1.1 Morfologie rostlin

Morfologie se zabývá studiem vnější stavby rostlinného těla. Nejdůležitější části rostliny jsou kořen, stonek a listy, jsou to orgány vegetativní, slouží k látkové výměně a zajišťují výživu rostliny [1].

##### ***Kořen***

Kořen upevňuje rostlinu v zemi, přijímá vodu s roztoky minerálních látek a zajišťuje jejich převádění do nadzemních částí. Hlavní kořen se většinou větví vytvořením postranních kořenů. Mimo hlavní a postranní kořeny se u některých rostlin vytvářejí ještě kdekoli na rostlině náhradní kořeny. Soubor všech kořenů tvoří kořenovou soustavu, kde jednotlivé kořeny jsou zastoupeny různým způsobem a vzájemně v různé míře. Svou povahou pak kořeny mohou být dřevnaté, dužnaté nebo duté [1],[4].

##### ***Stonek***

Stonek spolu s listy, pupeny a květy tvoří nadzemní část rostliny. Stonek je článkovitý, oddělený uzlinami, což jsou místa, ze kterých vyrůstají na stonku listy. Dutý stonek se nazývá stéblo, dužnatý lodyha a dřevnatý u stromů je kmen. Hlavní funkcí stonku je nést listy, květy a rozvádět roztoky nerostných látek z kořene do listů a organické asimiláty z listů do růstových pletiv. Stonek také napomáhá orientaci listů a vyzvedává květy nad ostatní části rostliny. Větvením stonku získávají rostliny charakteristický vzhled. Převážně nadzemní části stonku mají velký význam v kosmetickém průmyslu. Krycí pletiva stonku některých rostlin

poskytují významné vonné látky, například z kůry mladých větví skořicovníku *Laurus cinnamomum* pochází skořice. Z vyměšovacích pletiv v kmenech a větvích vytékají po poranění kleje (například z divoce rostoucích stromů západní a východní Afriky – *Acacia senegal*), pryskyřice (například žlutohnědá pryskyřice ze stromů v Indii – *Styrax tonkinensis*) a balzámy (například různé druhy kopajvového balzámu – *Copaifera langsdorfii*). Podle charakteru stonku a délky života rostliny rozlišujeme vytrvalé dřeviny se zdřevnatělým stonkem a jednoleté až vytrvalé byliny s bylinným stonkem [1], [2].

### **List**

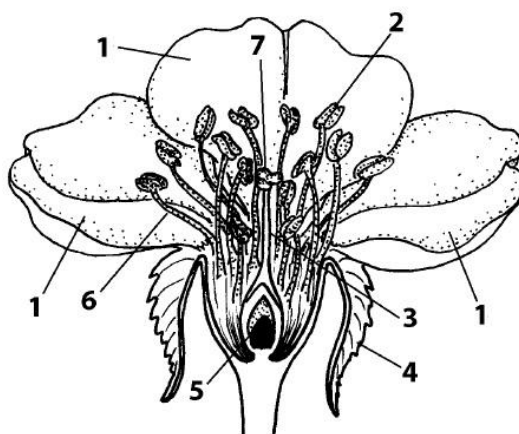
List představuje nejplastičtější rostlinný orgán. Je to postranní, většinou plochý, zelený orgán, omezeného růstu, sloužící především k fotosyntetické asimilaci a transpiraci. Listy plní i mnoho dalších sekundárních funkcí, funkci ochrannou, rozmnožovací, lapací, exkrekční, absorpční, opornou, zásobní aj. K plnění těchto úkolů bývají listy různě modifikovány. Ze stonku vyrůstají listy pouze v určitých místech označovaných jako nody (uzliny). Nejčastější je postavení listů střídavé, vstřícné a přeslenité. Listy jsou nejčastěji tvořeny rozšířenou, obvykle plochou listovou čepelí a řapíkem. Listová čepel může být jednoduchá nebo složená z několika lístků. Složené listy mohou být zpeřené a dlanitě složené. Obdobně jako v případě celistvých listů jednotlivé lístky mohou být připojeny k větenu řapíčkem, nebo mohou být přisedlé. Listy vznikají jako dočasné výrůstky stonku a jejich životnost je časově omezena, často na jedno vegetační období [1], [46], [47], [48].

### **Pupeny**

Pupeny jsou zárodky květů nebo listů, ukončují větev rostlin. Z květů vznikají plody, které chrání dozrávající semena. Ochranou jsou například bodliny plodů (durman), křídla (javor), chmýří (pampeliška) [4].

### **Květ**

Květ je tvořen květním lůžkem, květním obalem, tyčinkami a pestíky. Jeho velikost závisí na druhu rostliny a hlavní funkcí je zajištění pohlavního rozmnožování rostlin. Květy sestavené určitým způsobem na společném stonku vytvářejí květenství. Vůně květu má svůj původ v aromatických silicích, nejčastěji produkovaných korunou, a je stálým znakem rostliny. Koruna je vnitřní část květního obalu, je tvořena korunními lístky, které jsou zbarvené pomocí barviv rozpuštěných v buněčné šťávě [7].



Obrázek č. 2.1: Schéma květu. 1 – koruna, 2 – prašník, 3 – čnělka, 4 – kalich, 5 – semeník, 6 – tyčinka, 7 – blizna [7]

### 2.1.2 Anatomie rostlin

Anatomická stavba rostlin závisí na růstu, vnějším prostředí a fyziologické funkci rostlinného orgánu. Na rostliny působí celá řada sil, kterým musí vzdorovat. Staticky působí zemská přitažlivost, která se zvětšuje s růstem rostliny a snižuje při opadávání listů nebo plodů. Dynamicky působí vítr nebo dešťové kapky. Aby mohla rostlina odolávat působení těchto sil, musí mít určitou pružnost, pevnost a ohebnost. Podle složitosti stavby těla dělíme rostliny na jednobuněčné, nebuněčné a mnohobuněčné. Jednobuněčné rostliny jsou velice často tvořeny jedinou buňkou, patří sem například sinice. Typickým představitelem nebuněčných rostlin je mořská řasa, její celé tělo je vyplněno mnohoadernou protoplasmou. Rostliny mnohobuněčné představují vyšší vývojovou formu rostlin. Jednotlivé buňky jsou fyziologicky na sobě závislé, tvoří soubory, které se nazývají tkáně a pletiva [7].

#### ***Pletivo***

Pletivo je soubor spolu spojených a vzájemně interagujících buněk, které mají společný původ a vytvářejí strukturní a funkční celky. Lze je dělit dle vzniku na pravá, nepravá a smíšená, dle struktury na jednoduchá a složená, dle původu na dělivá a trvalá, dle funkce na krycí, nasávací, vodivá, zásobní, vyměšovací, provětrávací, asimilační a mechanická [7].

Jestliže se rozpustí nebo rozruší střední lamela, rozpadne se pletivo na jednotlivé buňky. Stává se tak například při působení různých chemikálií (tzv. částečné nebo úplné macerování). Při částečném macerování nedochází k úplnému rozpuštění střední lamely, ale pouze k změknutí nebo narušení mezibuněčné hmoty. Buňky sice drží pohromadě, ale již mírným tlakem je možno je od sebe oddělit. Přirozená macerace nastává běžně v přírodě při zahnívání rostlinných částí způsobeným vodou [7].

#### ***List***

Anatomicky list sestává ze svrchní a spodní epidermis (krycí pletivo), mezofylu (základní asimilační pletivo), které je prostoupeno cévními svazky, jež vytváří nervaturu listovou. V mezofylu se mohou nacházet pryskyřičné kanálky, mléčnice obsahující latex, exkreční buňky, idioblasty, sklereidy a fytolity. Epidermis listu je většinou jednovrstevná, méně často se můžeme setkat s vícevrstevnou. U některých rostlin je epidermis tvořena

několika typy buněk lišících se tvarem, velikostí a stupněm impregnace či inkrustace buněčných stěn. Vnější stěny pokožkových buněk bývají impregnovány kutinem. Kutin také, společně s voskem, vytváří kutikulu, na níž může být ještě vrstva epikutikulárního vosku. Hydrofobní povrchové vrstvy listů chrání rostliny před nadměrnou transpirací, před smáčením vodou, před patogeny a před radiací. Škodlivé UV záření pohlcují také bezbarvé flavonoidy ve vakuolách epidermálních buněk. U většiny rostlin bývají buňky svrchní epidermis větší, mají vyšší kutikulu a méně trichomů [47], [48].

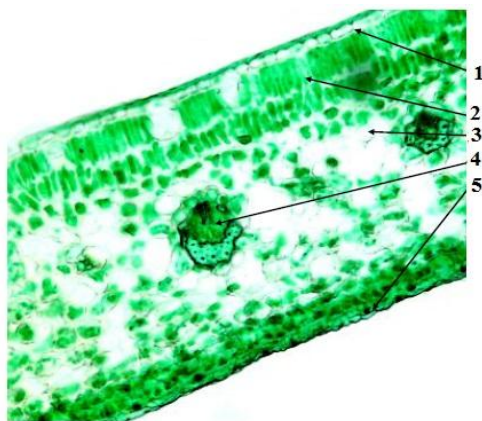
Heliofilní (slunné) listy na obvodu koruny mají, na rozdíl od sciofilních (stinných) listů uvnitř koruny, větší tloušťku listu, delší a rozvětvenější žilnatinu, více sklerenchymatických pletiv, menší epidermální buňky, silnější kutikulu a epidermis, větší počet chloroplastů, menší objem intercelulár, větší hustotu a menší délku stomat. Heliofilní listy mají často také menší plochu než listy sciofilní [47].

Stomata (průduchy) zajišťují výměnu plynů mezi ovzduším a mezofylem listů. Umožňují příjem oxidu uhličitého potřebného k fotosyntéze a příjem kyslíku potřebného k respiraci. Chloroplasty se většinou nacházejí pouze ve svěracích buňkách průduchů. Průduchovými šterbinami stomat také difunduje vodní pára z listu do ovzduší – stomatární transpirace. Nejčastěji jsou stomata rozložena na ploše listu rovnoměrně, u některých rostlin mohou vytvářet dvojice, např. v epidermis řapíku kapradě samce. Vzhledem k rovině epidermis mohou mít stomata různou polohu. Podle anatomické stavby svěracích buněk a podle mechaniky otevírání a zavírání průduchů lze rozlišit několik základních typů stomat: stomata typu *Amaryllis*, typu *Helleborus*, *Gramineae*, pteridofytního typu, gymnospermního typu. U zastíněných listů bývají stomata delší a méně četná než u slunných listů [48].

V pokožce se mohou vyskytovat různé typy výrůstků, například trichomy a chlupy. Trichomy mohou být jednobuněčné nebo vícebuněčné. Základními funkčními kategoriemi jsou krycí, žláznaté, absorpční a žahavé trichomy. Žláznaté nebo sekreční trichomy, které produkují směs sekundárních metabolitů (silic, éterických olejů a terpenoidů), mohou být stopkaté, nebo přisedlé, s jednobuněčnou nebo vícebuněčnou hlavičkou [48].

Především v listech se nacházejí rostlinná barviva, což jsou látky organického původu, které mají pro rostliny životní význam. Rozdělují se na barviva rozpustná v tucích (lipochromy) a barviva rozpustná ve vodě (hydrochromy). Lipochromy jsou obsaženy v plastidech, v tzv. chloroplastech a chromoplastech s vlastní DNA a ribozomy, patří k nim zelené chlorofyly, žluté xantofyly a červené karoteny. Chlorofyly mají svůj význam při fotosyntéze, xantofyly a karoteny způsobují žluté, oranžové a červené zbarvení listů, květů a plodů. Mezi hydrochromy patří antokyany, které jsou obsaženy ve vakuolách a způsobují modré, červené, fialové až černé zbarvení zejména květů a plodů a dokážou měnit svou barvu se změnou pH buněčné šťávy ve vakuolách. Tvorbu a hromadění chlorofylu ovlivňují genetické faktory, podmínky prostředí, ale také intenzita ozáření a jeho kvalita, půdní výživa, zásobování pletiv vodou, teplota prostředí (se zvyšující se teplotou roste rychlost hromadění chlorofylu) [2], [3], [9], [25].

Poslední plastidy, podle charakteru pigmentů jsou leukoplasty. Leukoplasty jsou bezbarvé, zásobní plastidy obsahující škrob, bílkoviny nebo tuky [9], [25].



Obrázek č. 2.2: Příčný řez listem citroníku (*Citrus lemon*). 1 – svrchní epidermis, 2 – palisádový parenchym, 3 – houbový parenchym, 4 – cévní svazek, 5 – spodní epidermis [7].

### **Květ**

Z anatomie květů hraje důležitou roli koruna, složená z mnoha významných částí. Svrchní pokožka je tvořena buňkami s bradavkovitými vychlípeninami, jež jí dodávají sametového lesku. Spodní pokožka obvykle není. V buňkách pokožky bývají přítomny silice. Kutikula je velice tenká, sotva patrná, takže výměna plynů se děje přímo pokožkou [7].

### **Plody**

Plody jsou z hlediska morfologie velmi různotvaré, proto i jejich anatomická stavba je velmi rozmanitá. Docela jinou stavbu mají plody dužnaté a jinou plody suché [7].

## **2.2 Charakteristika sledovaných rostlin**

### **2.2.1 Heřmánek pravý (*Matricaria chamomilla*)**

**Říše:** rostliny (*Plantae*)

**Podříše:** vyšší rostliny (*Eumobionta*)

**Oddělení:** krytosemenné (*Magnoliophyta*)

**Třída:** vyšší dvouděložné (*Angiospermae*)

**Řád:** hvězdnicotvaré (*Asterales*)

**Čeleď:** hvězdnicovité (*Asteraceae*)

**Rod:** heřmánek (*Matricaria*)



Obrázek č. 2.3: Heřmáněk pravý [4]

Je to jemně vonící, léčivá rostlina. Pro své žluté květní lůžko byl v Egyptě uctíván jako květ boha Slunce. Zmínky o jeho blahodárných účincích lze najít v mnoha sbírkách. Planě roste podél cest, na pustých místech, jako plevel na polích téměř po celém světě. Listy jsou střídavé, dvoj- až trojnásobně peřenodílné, celokrajné s plochými čárkovitými úkrojky. Květní lůžko je kuželovité a duté. Obvodové květní jazýčky jsou bílé, obvykle skloněné směrem dolů, vnitřní trubkovité květy jsou žluté. Kvete v červnu až srpnu. Nejdůležitějšími obsahovými látkami květu heřmánku jsou především chamazulen a bisabolol. Dalšími důležitými látkami jsou flavonoidy, cholin, hořčiny a sliz [4], [5], [6].

### 2.2.2 Levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*)

**Říše:** rostliny (*Plantae*)

**Podříše:** cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)

**Oddělení:** krytosemenné (*Magnoliophyta*)

**Třída:** vyšší dvouděložné (*Rosopsida*)

**Řád:** hluchavkotvaré (*Lamiales*)

**Čeleď:** hluchavkovité (*Lamiaceae*)

**Rod:** levandule (*Lavandula*)



Obrázek č. 2.4: *Levandule lékařská* [4]

Hustý polokeř s přisedlými, čárkovitými a celokrajnými listy, které jsou v mládí šedavě plstnaté, později zelenají. Blankytně modré pyskaté květy jsou uspořádány do konečného klasu na holých lodyhách a vydávají typickou vůni. Původně pochází ze západního Středomoří, kde se dosud pěstuje v oblasti Provence, Španělsku, Portugalsku, na východě pak v Bulharsku. U nás se pěstuje v teplejších oblastech. Sklízají se fialové květy v době, kdy se právě otevírají. Uřezávají se s lodyhou a suší na stinném místě. Kvality levandule jsou v bylinkářských spisech široce popsány. Zajímavý je poukaz na uklidňující účinky, tišení bolesti a její afrodiziakální účinky. Je to typická teplomilná rostlina vápenatých a písčitých stanovišť, která kvete v červenci a srpnu. Květ obsahuje především silici s linalylacetátem, borneolem, isoborneolem, cineolem, geraniolem, kafrem a dalšími terpeny, jemné třísloviny (kyselinu rozmarýnovou), kumariny a flavonoidy [4],[5], [6], [13].

### 2.2.3 Máta kadeřavá (*Mentha spicata*)

**Říše:** rostliny (*Plantae*)

**Podříše:** cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)

**Oddělení:** krytosemenné (*Magnoliophyta*)

**Třída:** vyšší dvouděložné (*Rosopsida*)

**Řád:** hluchavkotvaré (*Lamiales*)

**Čeleď:** hluchavkovité (*Lamiaceae*)

**Rod:** máta (*Mentha*)



Obrázek č. 2.5: Mята kadeřavá [4]

Trvalka s plazivým oddenkem a přímou, větvenou vysokou lodyhou. Listy má většinou přisedlé nebo kratičce řapíkaté, vřapaté, podlouhle vejčité, zašpičatělé, na lici jasně a na rubu šedavě zelené s nápadně vystupující nervaturou. Pyskaté, starorůžové až nafialovělé květy jsou seskupeny do štíhlých, válcovitých klasů. Celá rostlina má typickou vůni, postrádá ovšem menthol, který je pro mátu typický. Listy obsahují silici s karvonem, třísloviny, hořčiny, flavony, organické kyseliny [6].

#### 2.2.4 Meduňka lékařská (*Melissa officinalis*)

**Říše:** rostliny (*Plantae*)

**Podříše:** cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)

**Oddělení:** krytosemenné (*Magnoliophyta*)

**Třída:** vyšší dvouděložné (*Rosopsida*)

**Řád:** hluchavkotvaré (*Lamiales*)

**Čeleď:** hluchavkovité (*Lamiaceae*)

**Rod:** meduňka (*Melissa*)





Obrázek č. 2.6: Meduňka lékařská [4]

Ze Středomoří se dostala s Araby v 11. století do Španělska a odtamtud do Německa, kde ji mniši pěstovali v klášterních zahradách jako léčivku a vonnou bylinu. Tato vytrvalá, až 90 cm vysoká bylina má dlouze řapíkaté, tenké listy eliptického tvaru s vroubkovaně pilovitým okrajem čepele. Bledé květy mají starorůžový až namodralý nádech, někdy jsou žlutavé. Kvete od července do srpna. Nať je sbírána těsně před rozkvetem v době kolem poledne. Nejdůležitější obsahovou látkou listu je silice s obsahem geraniolu, citronelalu, citronelolu, linalolu a citralu. Ovšem je jí bohužel v listech velmi málo (0,05 – 0,80 %). Kromě silice obsahuje jemné třísloviny, hořčiny, flavonoidy, organické kyseliny a minerální látky [4], [5], [6].

#### 2.2.5 Šalvěj lékařská (*Salvia officinalis*)

**Říše:** rostliny (*Plantae*)

**Podříše:** cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)

**Oddělení:** krytosemenné (*Magnoliophyta*)

**Třída:** vyšší dvouděložné (*Rosopsida*)

**Řád:** hluchavkotvaré (*Lamiales*)

**Čeleď:** hluchavkovité (*Lamiaceae*)

**Rod:** šalvěj (*Salvia*)



Obrázek č. 2.7: Šalvěj lékařská [4]

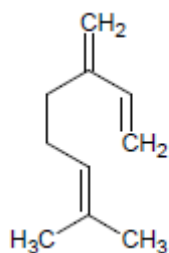
Pochází ze Středomoří a již od dob antiky je považována za symbol věčného života. Vytrvalý vonný polokeř dorůstající běžně kolem 20 – 25 cm, v dolní části dřevnatící. Dává přednost slunným stanovištím na suchých půdách. Lodyha má čtyřhranný průřez. Listy jsou podlouhle kopinaté, velmi jemně vroubkované. Mladé lístky jsou našedlé a plstnaté. Dvoupyské květy jsou fialové, zřídka bílé. Obsahují silice s thujonem, cineolem, kafrem, borneolem, třísloviny, hořčiny, flavonoidy, pryskyřičné látky, vitamíny skupiny B. Kvetे v červnu a v červenci [4], [5], [6].

### 2.3 Vonné látky rostlinného původu

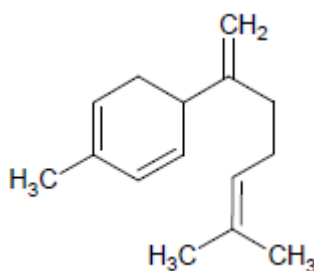
Přírodní vonné látky, silice, se získávají ze surovin rostlinného nebo živočišného původu. U rostlin jsou uloženy v siličných buňkách nacházejících se v různých částech rostliny, v kořenech a oddencích, kůře, listech, buňkách korunních lístků, v oplodí a semenech rostlin. Zpravidla jsou uloženy v nádržkách nebo kanálcích pletiv. Silice je charakteristicky a intenzivně vonící těkává olejová tekutina, nerozpustná ve vodě, dobře rozpustná v alkoholu, etheru, benzenu, chloroformu a v tucích. Je pestrá směsí látek, kterých bylo až doposud identifikováno více než 1000, přičemž jeden druh silice může obsahovat až několik desítek vonných látek. Především vlivem světla, tepla a vlhkosti nastávají v silici chemické reakce, které mění její vzhled a kvalitu [11], [14], [21], [25].

Většinu vonných látek řadíme do skupiny sloučenin označovaných jako terpeny, které obsahují vždy uhlovodíky a jejich deriváty. Jsou zastoupeny hlavně nízkomolekulárními těkavými látkami, především sem patří: alifatické monoterpeny ( $C_{10}H_{16}$ ) odvozené od p-menthanu, acyklické, monocyklické nebo bicyklické monoterpeny, acyklické, monocyklické nebo bicyklické seskviterpeny ( $C_{15}H_{24}$ ), diterpeny ( $C_{20}H_{32}$ ), triterpeny ( $C_{30}H_{48}$ ) a tetraterpeny ( $C_{40}H_{64}$ ). Sloučeniny tvořené pěti a sedmi izoprenovými jednotkami nebyly dosud v přírodě nalezeny. Diterpeny spolu s monoterpeny a seskviterpeny jsou přítomny v různých balzámech a pryskyřicích. Z monocyklických terpenů je nejrozšířenější limonen (kmínová, koprová silice), z bicyklických monoterpenů jsou důležité pinen, kamfen a jejich

kyslíkaté deriváty borneol a kafr (kafrová silice) [11], [12], [13], [25].

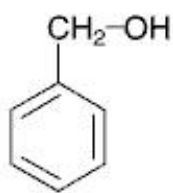


Obrázek č. 2.8: Alifatický monoterpen myrcen



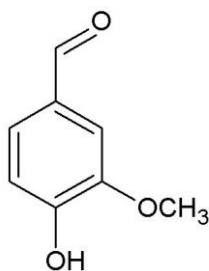
Obrázek č. 2.9: Monocyklický seskviterpen –  $\beta$ -bisabolen

Z derivátů jsou nejvíce zastoupeny organické sloučeniny aromatické i alifatické, v jejichž molekule se nejčastěji vyskytuje kyslík, dusík nebo síra, tj. alkoholy a jejich estery, aldehydy, ketony, fenoly. Typickými kyslíkatými deriváty terpenů jsou terpenové alkoholy. Mezi nejvýznamnější a nejrozšířenější patří například benzylalkohol, linalool (květy konvalinky, pomerančová a koriandrová silice), geraniol (eukalyptová a růžová silice), citronelol (růžová a geraniová silice) [25].



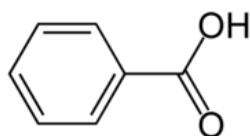
Obrázek č. 2.10: Benzylalkohol [13]

Z aromatických aldehydů jsou známy benzaldehyd, přítomný v glykosidu amygdalinu, skořicový aldehyd (pryskyřice Benzoe), vanilin (vanilková silice) vyskytující se v různých glykosidech, citral (pomerančová silice) [25].



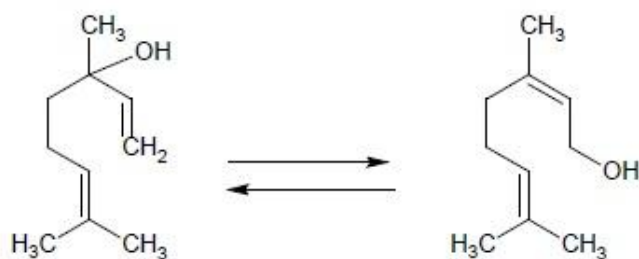
Obrázek č. 2.11: Vanilin [13]

Oxidací aldehydů vznikají aromatické kyseliny, z nichž nejrozšířenější je kyselina benzoová vyskytující se v glykosidech, silicích a pryskyřicích, a kyselina salicylová, která je hojně rozšířená ve formě esterů a glykosidů. Jako pryskyřice označujeme amorfni tuhé nebo polotuhé, transparentní organické látky bez chuti a zápachu, pevné výměšky rostlin. Klasifikují se podle stáří na fosilní (amberit), staré několik let až století (kopalové pryskyřice) a současné, vytékající z poraněných stromů. Jejich hlavní součástí jsou pryskyřičné kyseliny [25].



Obrázek č. 2.12: Kyselina benzoová [13]

Část látek silice nemá terpenoidní charakter, odvozuji se od fenylypropanu. Velký vliv na vůni i chuť silic mají uhlovodíky, které zhoršují jejich vydatnost, rozpustnost a stabilitu. Za pokojové teploty jsou silice bezbarvé nebo charakteristicky zbarvené tekutiny s hustotou většinou menší než  $1 \text{ g.cm}^{-3}$ . Barevnost aromatických sloučenin je důsledkem jejich struktury, je způsobena tím, že sloučeniny s určitým vnitřním uspořádáním jsou schopny pohlcovat jistou oblast viditelného záření, takže naše oko je vnímá v tzv. doplňkové barvě, tzn. registruje jen tu jeho část, která nebyla sloučeninou absorbována. Sloučeniny s jednoduchými vazbami jsou vždy bezbarvé, jsou schopny absorbovat jen v oblasti pro nás neviditelné, v ultrafialové [11], [12], [13], [25], [45].



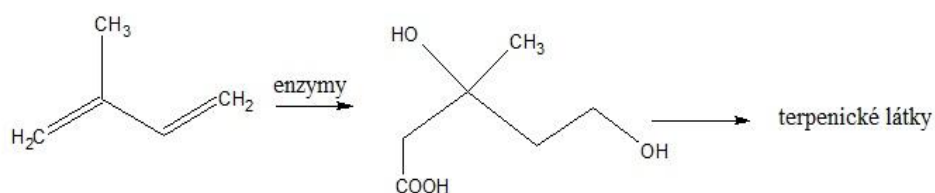
Obrázek č. 2.13: Terpenové alkoholy: Isomerace linaloolu za vzniku nerolu [13]

### 2.3.1 Biosyntetické postupy vzniku vonných látek

V průběhu vegetace probíhá v rostlinách množství složitých biochemických procesů, jejichž výsledkem jsou dvě skupiny produktů. V první řadě jsou to látky nezbytné pro růst rostliny, tzv. látky primárního metabolismu, kam patří cukry, tuky a bílkoviny. Druhou skupinou jsou látky, které rostlina vytváří při degradaci vysokomolekulárních produktů primárního metabolismu, tzv. látky sekundárního metabolismu. Rostlina je ke svému vývoji nezbytně nepotřebuje. Vznik silic v rostlinných organismech probíhá dvěma biosyntetickými postupy, mevalonátovým a šikimátovým postupem [10], [14].

#### *Mevalonátový postup*

Terpenické látky vznikají kondenzací izoprenových jednotek za přítomnosti specifických enzymů. Jedním z meziproduktů je kyselina mevalonová. V dalších stupních pak postupně vznikají prekursory terpenů a konečně všechny terpenické látky vyskytující se v silicích. Jsou to např. uhlovodíky, mezi které patří i limonen, aldehydy, jako např. citral, řada alkoholů např. linalool, geraniol, z esterů např. linalylacetát [10], [14].

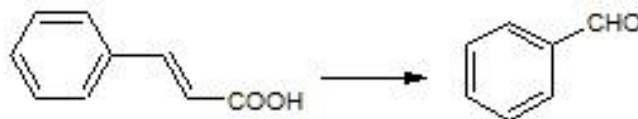


Obrázek č. 2.14: Mevalonátový postup [14]

#### *Šikimátový (fenylpropanový) postup*

Je to postup, kdy vznikají látky, které mají jako základ aromatické jádro. Výchozí surovinou je glukóza, z které přes řadu meziproduktů vzniká meziprodukt kyselina šikimová,

produktem je kyselina skořicová, která je zároveň výchozí sloučeninou pro biosyntézu řady vonných látek, jako jsou kumariny a jejich deriváty nebo fenolické látky, např. eugenol [10], [14], [26].



Obrázek č. 2.15: Vznik benzaldehydu z kyseliny skořicové [14]

Fenolické látky představují heterogenní skupinu sekundárních metabolitů, patří k látkám s regulační aktivitou. Z fenolických látek jsou to různé deriváty kyseliny hydroxybenzoové, například kyselina salicylová nebo vanilin, dále deriváty kyseliny skořicové, kyseliny kávové, deriváty kumarinu, flavonoidy nacházející se v citrusech, třísloviny nebo polymerizovaný lignin. Jejich biosyntézu silně ovlivňuje světlo, teplota prostředí, hladina cukrů a ethylen [11].

Rozdílné chemické složení silic zapříčiní různé odchylky ve vůni. Ke změně vůně dochází z důvodu toho, že silice je získána z různého botanického rodu rostliny nebo v jiném vegetačním stádiu rostliny, případně i z jiné části rostliny než je běžně používána. Nemalý vliv mají i technologické postupy při výrobě, klimatické podmínky, způsoby hnojení a tedy i obsah minerálních prvků v půdě. Nevratné zhoršení vůně může nastat vlivem špatného skladování, kdy dochází k mnoha chemickým reakcím, například k oxidaci, kdy nenasycené sloučeniny obsažené v silicích, obzvláště terpenové uhlovodíky, pod vlivem kyslíku ze vzduchu snadno oxidují. Tyto reakce jsou urychlovány přítomností těžkých kovů, především sloučeninami mědi, a to již při velmi malých koncentracích a nízké teplotě. Během skladování může dojít ke všem chemickým procesům, které mohly být započaty již během destilace. Za nižší teploty probíhají tyto procesy pomaleji, ale při dlouhém skladování mohou nabýt na významu. Vonné přírodní látky, tzv. silice, používané nejenom v kosmetickém průmyslu se dostávají na trh pod názvem esenciální oleje nebo éterické oleje, případně jako tzv. konkrétní silice nebo tzv. absolutní silice, dále ve formě extraktů, tinktur nebo pomád dle zvoleného výrobního technologického postupu [11], [13], [14].

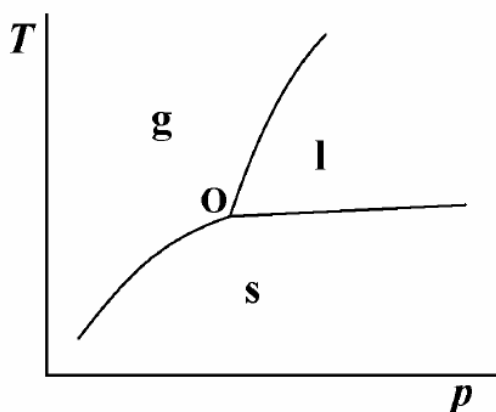
Téměř z každé vonné rostlinné části může být vyráběna vonná látka. Důkladná znalost vonných látek, získaných z částí rostlin, pomůže rozeznat mnohdy zcela nepatrné rozdíly vonných látek [11].

## 2.4 Metody získávání přírodních vonných látek

Technologické postupy, kterými se vonné látky získávají, můžeme rozdělit do tří základních skupin: destilace, extrakce a lisování [11].

### 2.4.1 Destilace vodní parou

Tato fyzikální separační metoda patří k nejběžnějším a jednoduchým postupům získávání silic. Umožňuje dělení kapalných látek s podstatně vyššími body varu, kdy rychlost destilace je řízena tlakem a množstvím přiváděné páry. Principem destilace je převedení kapaliny v páru zahřátím, odvedení páry a její kondenzace. Při zahřívání těkavých kapalin se postupně zvyšuje parciální tlak par dané látky nad kapalinou, až dojde k jeho vyrovnání s okolním tlakem (atmosférickým). Závislost teploty varu na vnějším tlaku lze pozorovat ve fázovém diagramu. Destilací vodní parou lze získat destiláty málo těkavých kapalin, jež se nemísí s vodou nebo jsou s ní mísitelné jen omezeně [11], [15], [26], [39].



Obrázek č. 2.16: Schéma stavového diagramu:  $O$  – trojný bod,  $s$  – pevná fáze,  $l$  – kapalná fáze,  $g$  – plynná fáze [39]

Jedno z možných uspořádání je umístění suroviny nad zdroj páry, například do děrovaného koše, kdy vodní pára s sebou strhává uvolňující se silici, která se usazuje jako olejovitá vrstva v jímaném destilátu. Ta se odděluje, vysušuje a dále se zpracovává. Jde o velmi šetrný způsob získávání silic z nejjemnějších surovin. Mezi další uspořádání patří takové, kdy je surovina zcela oddělena od zdroje páry, pára se přivádí k surovině skleněnou trubicou [11], [14], [15].

Na jakost vyrobené silice má vliv mnoho faktorů. Mezi nejzákladnější patří vliv rostlinného materiálu. Z materiálu, který je zapařený, plesnivý, znečištěný nebo pomíchaný s jinými botanickými druhy získáme silice o nižší kvalitě. Dalším vlivem je použitá aparatura a technologie. Po oddělení silice od vody se olej vysuší bezvodým síranem sodným a přefiltruje. Tím získáme silici zbavenou nečistot, které s sebou strhla pára během destilace [11], [16].

### 2.4.2 Extrakce

Extrakce je dělicí metoda, při které se vonné látky získávají obvykle při nižší teplotě než při destilaci vodní parou. U extrakce kapaliny kapalinou, z pohledu fyzikální chemie, jde o přechod složky fázovým rozhraním mezi dvěma vzájemně nemísitelnými kapalinami. Přechod částice z jedné fáze do druhé je způsoben interakcí molekul rozpouštědla s molekulami rozpuštěné látky. Selektivita je dána povahou sil uplatňujících se při

rozpouštění. Na znalosti typu těchto interakcí je založena volba vhodného rozpouštědla. Extrakce tuhé látky kapalinou se používá hlavně pro biologické a přírodní vzorky. Je často metodou velmi zdoluhavou, jelikož difúze extrahované látky tuhou matricí je pomalá, proto je důležité, aby materiál byl jemně rozetřen a bylo tak dosaženo co nedokonalejšího kontaktu rozpouštědla a extrahované tuhé látky. Produkt získaný extrakcí rostlinného materiálu a následným oddestilováním rozpouštědla je zpravidla voskovitá, polotuhá hmota a nazývá se konkrétní silice. Kromě vonných látek obsahuje ještě vosky, které jsou v kosmetickém průmyslu nežádoucí, a proto se upravuje na tzv. absolutní silici [6], [11], [14], [16], [17], [38].

### ***Enfleurage***

Jednou z nejstarších metod je extrakce pomocí tuku, jde prakticky o absorpci do tuku za studena, za normální pokojové teploty případně pomocí roztavených tuků. Používá se nesolené sádlo nebo olivový olej bez zápachu. Tento způsob izolace se v průběhu staletí zdokonaloval. Spočívá v pokládání čerstvě natrhaných květů na vrstvu tuku, nanesenou zpravidla na skle v dřevěném rámečku. Vrstva tuku pak zachycuje silici, která se z květů vypařuje. Květy se na tuk kladou opakovaně, dokud tuk není silicí nasycen. Tuk nasycený silicí (tzv. pomáda) se pak extrahuje lihem. Výluh se vymrazí a filtruje a vzniká tzv. lavage. Z lavage se oddestiluje líh a zbytek silice se nazývá absolutní. Tato metoda je poměrně náročnou a nákladnou metodou pro získávání silice z nejdražších květů, jako například z květů jasmínu [14].

### ***Infúze***

Jednoduchou extrakční metodou je infúze. Jde o extrakci za použití vroucí vody jako rozpouštědla. Své využití nachází při extrakci tříslovin z chmele [11].

### ***Soxhletova extrakce***

Kontinuální extrakce, tzv. Soxhletova extrakce, patří mezi nejstarší extrakční metody. Je využívána pro extrakci látek z tuhých matric. Hlavní výhodou je, že vzorek je neustále extrahován čistým rozpouštědlem. Mezi hlavní nevýhody Soxhletovy extrakce patří dlouhé trvání extrakce s použitím velkého množství rozpouštědla. Mezi nově vzniklé metody odvozené od Soxhletovy extrakce se řadí automatizovaná Soxhletova extrakce, tzv. Soxtec. Tato metoda je rychlejší než klasická Soxhletova extrakce, jelikož kontakt mezi vzorkem a rozpouštědlem je v první fázi mnohem důraznější díky ponoření extrakční patrony se vzorkem přímo do vroucího rozpouštědla, takže dochází k rychlejšímu přenosu hmoty. Ve druhé fázi nastává Soxhletovský mod (extrakční patrona je vytažena z vroucího rozpouštědla a vzorek je oplachován čistým rozpouštědlem vytvářeným kondenzací jeho par v chladiči) a v poslední třetí fázi dochází k zakoncentrování extraktu odpařením převážné části rozpouštědla a jeho zachycením v horní části přístroje [20], [38].

Snaha dnešního století je co nejvíce šetřit životní prostředí, proto své uplatnění nacházejí metody s použitím menšího množství tzv. zeleného rozpouštědla a s krátkou dobou extrakce, tzv. mikroextrakční techniky. Dochází k využití ultrazvukových vln (ultrazvuková extrakce) nebo mikrovln (mikrovlnná extrakce). Pro svou jednoduchost, selektivnost, rychlost a citlivost je vhodná mikroextrakce tuhou fází například z rovnovážné plynné fáze (HS-SPME) nebo ve spojení s hydrodestilací (HD-SPME) [20].

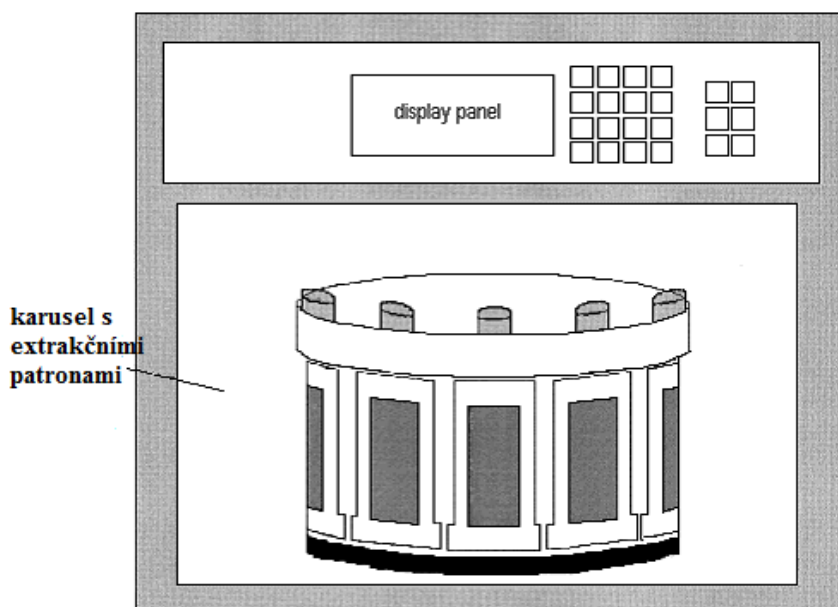


### ***Ultrazvuková extrakce (UE)***

Je to metoda, kdy výkonné ultrazvukové přístroje pomáhají docílit maximalizaci výtěžku a zkrácení doby procesu extrakce dosažením rychlejší kinetiky. Účinky ultrazvuku při šíření ve sledovaném prostředí závisí na jeho intenzitě a frekvenci a na vlastnostech prostředí. Principem je rozbití buněk působením ultrazvukové kavitace na buněčný materiál, čímž dochází k uvolňování intracelulární hmoty. Ultrazvuk působí na buněčné stěny rostlin dvěma způsoby. Prvním způsobem je usnadnění botnání a hydratace rostlinných materiálů, což způsobuje rozšíření pórů buněčné stěny. Druhý způsob je rozrušení vnějších žláz zaplněných silicemi, tím dochází k uvolnění silice do extrakčního rozpouštědla. To zvyšuje rychlost přenosu hmoty [19], [27], [28].

### ***Mikrovlnná extrakce (MAE)***

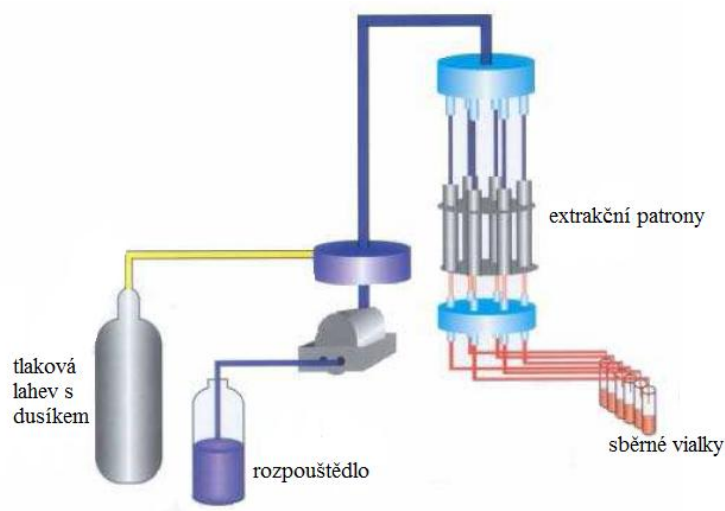
Mikrovlny jsou elektromagnetické vlny patřící do frekvenčního pásma 300 MHz – 300 GHz, což odpovídá vlnové délce 1 m – 1 mm. Během dielektrického ohřevu dochází k přeměně energie mikrovln na energii tepelnou působením elektrického pole na polární molekuly materiálu. Dipóly molekul se neustále natáčí podle okamžitého směru elektromagnetického pole. Metoda je tedy založená na absorpci energie mikrovln molekulami polárních sloučenin. Efektivnost MAE závisí na vlastnostech rozpouštědla, na stavbě rostlinného vzorku, tzn. na tloušťce buněčné stěny, propustnosti materiálu a makromolekulární struktuře. Vlivem lokálního zahřátí dochází ke zvyšování tlaku uvnitř a rychlejšímu přechodu látek z buněk do extrakčního činidla, které je propustné pro mikrovlny a není jimi zahříváno, dochází ke snižování extrakčního času, spotřeba rozpouštědla je rovněž nižší [22], [27], [28].



*Obrázek č. 2.17: Schéma uzavřeného mikrovlnného systému [37]*

### ***Tlaková extrakce rozpouštědlem (PSE)***

Tlaková extrakce rozpouštědlem je technika extrakce vzorku, která kombinuje zvýšenou teplotu a tlak ve spojení s kapalnými rozpouštědly, a to k dosažení rychlé a efektivní extrakce analytu z pevného vzorku. Existují dva hlavní důvody pro zvýšenou extrakční účinnost organických rozpouštědel při vyšších teplotách a tlacích. Jsou jimi vlivy rozpustnosti a přenosu hmoty a narušení povrchové rovnováhy. Vliv rozpustnosti a přenosu hmoty je dán skutečností, že při vyšších teplotách se zvyšuje rozpouštěcí kapacita rozpouštědla vůči extrahovaným složkám. Se vzrůstající teplotou se zvyšuje rychlost difuze vlivem vyšší hodnoty difuzního koeficientu. V důsledku toho se zvyšuje i rychlost extrakce, kterou lze ještě zvýšit přivedením čistého rozpouštědla. Tím se zvýší i hodnota koncentračního gradientu, tj. hnací síly extrakčního procesu. Na narušení povrchové rovnováhy má tedy významnou roli teplota a tlak. Při vyšších teplotách dochází k rozrušení silných interakcí mezi maticí vzorku a analytem založených na van der Waalsových silách, vodíkových vazbách nebo dipólových přitažlivých silách mezi molekulami extrahované složky a aktivními centry tuhé matrice. Tepelná energie může překonat kohezni (analyt – analyt) i adhezní (analyt – vzorek) interakce vlivem snižování aktivační energie potřebné pro desorpční proces. Snižuje se také viskozita rozpouštědla, což společně se snižováním povrchového napětí analytu, rozpouštědla i matrice usnadňuje jeho penetraci do vzorku. Hlavní úloha zvýšeného tlaku především spočívá v udržování kapalného stavu použitého rozpouštědla při extrakčních teplotách nad jeho atmosférickým bodem varu [22].



*Obrázek č. 2.18: Schéma extrakce PSE [36]*

### **2.4.3 Lisování za studena**

Tato metoda je vyhrazena především pro výrobu silic z citrusových plodů, u kterých se silice nacházejí v různé hloubce kůry plodu. Při mechanickém namáhání plodů se získá vodní emulze, která se následně odstředí. Všechny takto získané silice se musí dále čistit a upravovat, abychom odstranili zejména látky chemicky nestálé, které jsou v lihu špatně rozpustné, jelikož obsahují vysoký podíl terpenických a seskviterpenických uhlovodíků, jež pro vůni a chuť silice nemají podstatný význam. Vznikají tzv. deterpenované silice, které jsou

odolnější vůči oxidaci nebo polymeraci, lépe rozpustné v lihu a také mnohonásobně vydatnější [14].

## 2.5 Rozpouštědla

### 2.5.1 Voda, nevodná a směsná rozpouštědla

Rozpouštědlo je látka se schopností rozpouštět látky za vzniku homogenní směsi, je ve směsi v nadbytku. Takový roztok je široce využíván v analytických laboratořích a průmyslu, ať již jako vhodné prostředí pro reakce, pro extrakci látek, pro transport látek při separaci nebo pro studium vlastností rozpouštěných látek [38].

Voda je považována za tradiční rozpouštědlo, neboť je dostupná a levná. Rozpouštědel jiných než voda existuje celá řada, jak anorganických, tak i organických obsahujících různé atomy uspořádané do mnoha funkčních skupin vedoucí k pestrým fyzikálně-chemickým vlastnostem. Základními vlastnostmi pro popis těchto rozpouštědel jsou teplota tuhnutí, teplota varu, hustota, viskozita, povrchové napětí. Důležitou veličinou všech rozpouštědel je relativní permitivita a velikost dipólového momentu vypovídající o polaritě dané molekuly. Tyto veličiny nám pomáhají určit, jaké typy interakcí bude dané rozpouštědlo upřednostňovat v kontaktu s jinými molekulami, rozhodují o tom, zda je dané rozpouštědlo vhodné či méně vhodné pro účel použití, jelikož je důležité, aby molekuly rozpouštěné látky pronikly mezi molekuly rozpouštědla a obráceně [38].

Žádaných vlastností rozpouštědla lze dosáhnout použitím směsi několika rozpouštědel. V tomto případě, za předpokladu ideálního chování směsi se často můžeme setkat s aditivním účinkem, tedy může dojít k zefektivnění extrakce [38].

Nejběžnějším je dělení rozpouštědel podle jejich polaritě (tzv. eluotropní řada rozpouštědel) a následně podle jejich acidobazických vlastností [38].

Tabulka č. 2.1: Eluotropní řada rozpouštědel [35]

Nepolární rozpouštědla				Polární rozpouštědla			
Název	Relativní permitivita $\epsilon$	Teplota varu [°C]	Hustota [kg/m <sup>3</sup> ]	Název	Relativní permitivita $\epsilon$	Teplota varu [°C]	Hustota [kg/m <sup>3</sup> ]
hexan	1,90	69,00	655,00	ethylacetát	6	77,1	897
cyklohexan	2,00	80,74	779,00	acetonitril	37,5	82,00	786,00
sirouhlík	2,60	46,30	1260,00	butanol	17,1	117,7	810
toluen	2,40	110,60	867,00	tetrahydrofuran	7,6	66,00	889,00
benzen	2,30	81,00	876,00	ethanol	24,3	78,37	789
diethylether	4,30	35,00	713,00	methanol	32,6	64,7	792
chloroform	4,80	61,00	1490,00	kyselina octová	6,15	118,1	1050
aceton	20,70	56,00	791,00	voda	81,6	100	1000

V současné době je mnoho extrakcí založeno na mikroextrakčních technikách, neustále jsou však využívány i klasické extrakční techniky spojené se značnou spotřebou těkavých organických rozpouštědel. Tato rozpouštědla ovšem značně znečišťují životní prostředí,

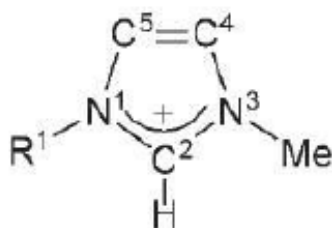
protože je obtížné je recyklovat. Většina organických rozpouštědel jsou toxická, těkavá a drahá, proto se moderní extrakční metody zaměřují na extrakce bez použití rozpouštědel, případně na používání ekologicky nezávadných alternativních rozpouštědel. Mezi taková rozpouštědla patří iontové kapaliny, nadkritické tekutiny, např. superkritický CO<sub>2</sub>, podkritická stlačená voda a fluorové fáze [20].

*Tabulka č. 2.2: Rozdělení rozpouštědel do kategorií dle principů zelené analytické chemie [20]*

<b>Preferovaná rozpouštědla</b>	<b>Použitelná rozpouštědla</b>	<b>Nežádoucí rozpouštědla</b>
voda	cyklohexan	pentan
aceton	heptan	hexan
ethanol	toluen	diisopropylether
propan-1-ol	methylcyklohexan	diethylether
propan-2-ol	isooktan	dichlormethan
ethylacetát	acetonitril	dichlorethan
isopropylacetate	tetrahydrofuran	chloroform
methanol	xyleny	pyridin
methylethylketon	dimethylsulfoxid	benzen
butan-1-ol	kyselina octová	dioxan
<i>t</i> -butanol	ethylenglykol	dimethoxyethan
	methyl- <i>t</i> -butyl ether	tetrachlormethan

## 2.5.2 Iontové kapaliny

Jako iontové kapaliny jsou označovány látky, které sestávají z organického kationtu a anorganického nebo organického aniontu. Organické kationty, jsou často neuspořádané, objemné a obsahují kvartérní atom dusíku. Bod tání mají nižší než 100 °C. V praxi se nejčastěji používají iontové kapaliny, které jsou kapalné i za pokojové teploty, tzv. room temperature ionic liquids (RTILs). Mezi hlavní výhody iontových kapalin patří prakticky nulová tenze par, vysoká termolabilita, nízká toxicita, nehořlavost a velmi široké teplotní rozmezí, v němž jsou kapalné a mají unikátní solvatační vlastnosti. Své využití nacházejí při řadě chemických reakcí jako náhrada těkavých organických rozpouštědel a rovněž při přípravě a zpracování vzorků. Tyto kapaliny jsou šetrné k životnímu prostředí a patří mezi tzv. zelená rozpouštědla. Mohou mít vlastnosti hydrofilní nebo hydrofobní, záleží na struktuře kationtu a aniontu [29].



Obrázek č. 2.19: Struktura 1-alkyl-3-methylimidazolia [30]

Iontových kapalin je velké množství. Nejčastěji se dělí podle kationových struktur. Iontové kapaliny typu 1-alkyl-3-methylimidazolium mají jedinečné vlastnosti díky aromatické struktuře kationtu. Struktura obsahuje delokalizované centrum mezi C<sub>2</sub> a N<sub>3</sub> a dvojnou vazbu mezi uhlíky C<sub>4</sub> a C<sub>5</sub>. Atom uhlíku C<sub>2</sub> je pozitivně nabitý z důvodu elektronového deficitu C=N vazby, atomy uhlíku C<sub>4</sub> a C<sub>5</sub> jsou neutrální, to má za následek kyselé chování atomu vodíku C<sub>2</sub> [30].

Tabulka č. 2.3: Vlastnosti vybraných iontových kapalin [40]

Název	Teplota varu [°C]	Hustota [kg/m <sup>3</sup> ]	Viskozita [mPa]	Teplota tání [°C]
1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imid	190,5	1530	62,8	– 9
1-butyl-3-methylimidazolium trifluoromethansulfonát	> 100	1292	není definováno	– 15
1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborát	> 100	1210	není definováno	– 71

### 2.5.3 Intermolekulární síly

Při rozpouštění látek v rozpouštědle se uplatňují intermolekulární síly. Soudržné síly v rozpouštěné látce musí být překonány a ve struktuře rozpouštědla musí být vytvořena mezera pro rozpouštěnou látku. Zároveň intermolekulární přitažlivé síly mezi rozpouštěnou látkou a rozpouštědlem musí být silnější než mezi látkami samotnými [42].

V nepolárních látkách jsou především slabé mezimolekulové interakce, v látkách polárních jsou molekuly vázány s vyššími vazebnými energiemi. Při rozpouštění a následné solvataci jsou uplatňovány van der Waalsovy síly (především coulombické síly), vodíkové vazby a elektron-donor akceptorové interakce [38],[42].

Obecně platí klasické Liebigovo pravidlo, že „podobné rozpouští podobné“, tedy polární látky se dobře rozpouští v polárních rozpouštědlech a nepolární látky v nepolárních. Hildebrand definoval parametr rozpustnosti  $\delta$ . Například jod se dobře rozpouští v ethanolu [41].

Tabulka č. 2.4: Hodnoty Hildebrandova parametru rozpustnosti pro vybraná rozpouštědla a látky [41]

Rozpouštědlo	$\delta$ [MPa <sup>1/2</sup> ]	Látka	$\delta$ [MPa <sup>1/2</sup> ]
hexan	14,9	kyselina benzoová	23
ethanol	26,1	jod	29
methanol	29,7	jodičnan cíničitý	23
voda	48	síra	25
aceton	19,7		

## 2.6 Analytické metody

Kvalita vonných látek se nejprve určovala pomocí senzorické analýzy. Bohužel posuzovatelé byli mnohdy ovlivňováni různými náladami nebo předsudky, nevhodnou stravou, návyky. Dnes ovšem senzorická analýza má svá pravidla sepsaná v normách, a tak se stala významnou hodnoticí metodou kvality vonných látek [11].

O kvalitě vonné látky nám napoví i stanovení jejích fyzikálních a chemických vlastností, mezi které patří index lomu, rozpustnost, hustota, optická aktivita, bod tání, barva. Skutečností je ovšem to, že prakticky neexistuje taková přírodní surovina, která by měla ze všech sklizní a výroben úplně stejné složení, tedy neměnnou kvalitu [11].

Modernějšími metodami lze izolovat a identifikovat mnoho vonných složek, ovšem zdaleka ne všechny. Jsou to především chromatografické a spektrální metody. Před provedením zvolené analýzy je důležité vzorek správně odebrat a případně upravit. Při analýze vonných látek se využívá rozdělovací nebo adsorpční plynové chromatografie, a v neposlední řadě nachází své využití i papírová a tenkovrstvá chromatografie [10], [11].

### 2.6.1 Plynová chromatografie (GC)

Analytická metoda plynové chromatografie se používá pro analýzu plyných vzorků, kapalných vzorků, pevných vzorků bez úpravy nebo po jejich zakoncentrování. Tento druh separační metody nese své označení podle skupenství mobilní fáze, kterou je inertní plyn. Metoda využívá rozdělení analytu mezi pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární) fázi v koloně, na základě adsorpce nebo rozpouštění, za předpokladu rovnovážného rozdělení. Jako zdroje pohybu mobilní fáze využívá GC tlakový spád. Účinnost chromatografického systému je určena počtem teoretických pater, které závisí na průměrné lineární rychlosti mobilní fáze [20], [26].

Pro dobré rozdělení jednotlivých frakcí je důležitá volba správné teploty kolony a náplně. Kolonu se stacionární fází volíme podle charakteru vzorku a podle rozsahu teplot varu separovaných látek. Obecně platí, že zvolená stacionární fáze má být podobného typu jako analyzovaný vzorek. Metoda se používá pro velmi široký rozsah koncentrací analytů v rozsahu 0,1 – 10 ppm, kde jejich stanovení vychází z vyhodnocení elučního profilu. Retenční čas látky je kvalitativní charakteristikou a plocha nebo výška píku odráží celkové

množství analytu [11], [20].

### ***Princip a instrumentální uspořádání GC***

Mobilní fázi v plynové chromatografii je nejčastěji vodík a helium, méně často dusík, argon nebo oxid uhličitý. Hustota a viskozita plynu je důležitá, protože tyto vlastnosti ovlivňují difúzi a průtok plynu kolonou. Když je potřeba pracovat s většími rychlostmi toku nosného plynu kolonou, je vhodné použít nosný plyn s menší viskozitou. Výběr nosného plynu má také vliv na rozlišení jednotlivých látek. Zdrojem nosného plynu jsou nejčastěji tlakové lahve, které jsou plněny maximálně na 20 MPa a jsou označovány nezaměnitelnými barvami [20].

Z tlakové lahve přechází plyn redukčním ventilem do čistícího zařízení, které plyn zbavuje nežádoucích příměsí. Nečistoty mohou interagovat s analytem nebo stacionární fází a tím zásadně ovlivnit přesnost výsledků, z toho důvodu je čistota plynu obzvlášť důležitá [20].

Analýzovaný vzorek se mikrodávkočem zavádí do toku nosného plynu v dávkovacím zařízení, zpravidla jako roztok v těkavém rozpouštědle, v plynném skupenství přichází do kolony, kde dochází k separaci směsi na jednotlivé složky, na základě interakcí se stacionární fází. Plynová chromatografie využívá především slabých interakcí, disperzní interakce, méně polární/dipolární a jen výjimečně se uplatňují interakce přenosu náboje (acidobazické) [20].

Při dávkování je třeba dopravit vzorek v co nejkratším čase do kolony, aby se nezměnily tepelné a tlakové podmínky v koloně a po dobu dávkování nedocházelo ke změně složení vzorku a došlo k okamžitému vypaření vzorku. Kapaliny se dávkuje pomocí mikrodávkočů přes septum ze silikonové gumy. Teplota injektoru se volí tak, aby vzhledem k použitému rozpouštědлу došlo k mžikovému odpaření. Obecně lze v podmínkách plynové chromatografie analyzovat látky až do teploty varu  $T_v \leq 800\text{ }^{\circ}\text{C}$ , počtu uhlíkových atomů v molekule  $\leq 100$  a relativní molekulové hmotnosti  $M_r \leq 1600$ . K vlastnímu dávkování lze využít několika typů injekčních technik: děličové (split), bezděličové (splitless), přímý nástřik na kolonu (on column) aj. Přímý nástřik na kolonu je vhodnou technikou pro kolony s vyššími průměry. Nástřik se provádí při teplotě nižší než bod varu rozpouštědla. Po rychlém nástřiku se teplota zvýší a vzorek se odpaří. Nástřik pomocí děliče toku je vhodný pro kolony s menšími průměry (kapilární). Dochází k přivedení jen zlomku průtoku injektoru na kolonu. Technika je vhodná pro koncentrované vzorky. Bězděličový nástřik je rovněž vhodnou technikou pro kapilární kolony. Pozvolna se přivádí větší objem vzorku. Technika je kombinací pomalého průtoku při vypaření vzorku a rychlého průtoku pro vymytí lineru. U moderních chromatografů je lidský faktor (eliminace nepřesností) nahrazen automatickým nástřikem vzorku – autosamplerem.

Kolona je umístěna v termostatu, který může pracovat v režimu konstantní (izotermický děj) nebo programově měněné teploty. V náplňových kolonách je dostatečné množství stacionární fáze, kolona se nepřetíží ani při dávkování většího množství vzorku. Do kapilárních kolon je důležité dávkovat malá množství vzorku a ve velmi malých objemech kvůli jejich menšímu průměru. Náplňové kolony jsou vyrobeny ze skla, nerezové oceli nebo jiného kovu, obvykle o vnitřním průměru 2 až 3 mm a délce 2 až 6 m. Kolony jsou plněny porézním inertním nosičem o průměru částic 40 až 350  $\mu\text{m}$  smočeným vrstvou kapalné stacionární fáze nebo adsorbentem, případně molekulovým sítem. Mají obecně nižší separační

účinnost. Kapilární kolony jsou tvořeny křemennou kapilárou, která má na vnějším povrchu vrstvu ochranného polymeru - polyimidu. Vnitřní průměr se pohybuje v rozmezí 0,1 až 0,53 mm a délka nejčastěji v rozmezí 10 až 100 m. Podle umístění stacionární fáze v kapilární koloně rozlišujeme dva druhy. První jsou kolony, které mají kapalnou stacionární fázi nanesenou v tenké vrstvě na vnitřní straně stěny kapiláry, tzv. WCOT (Wall-Coated Open Tubular). Druhé jsou kolony, které mají na vnitřní stěně nanesenou vrstvičku adsorbentu nebo molekulového síta, označované jako PLOT (Porous Layer Open Tubular). Kapilární kolony s chemicky vázanou stacionární fází se vyznačují vysokou separační schopností, umožňující separovat i více než 100 složek vzorku [20], [26], [49].

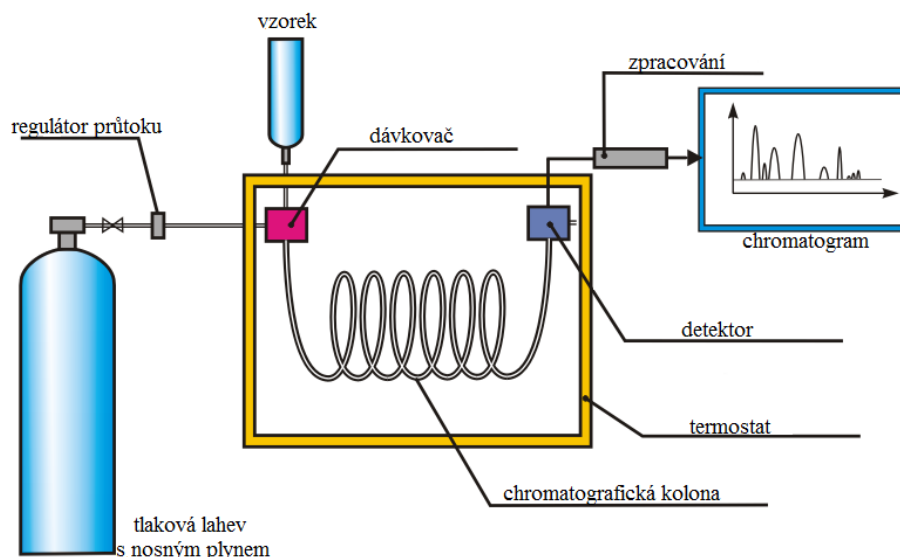
Složky opouštějící kolonu zaznamená detektor. Je to zařízení, které kontinuálně sleduje složení eluátu a převádí tuto informaci na elektricky měřitelnou veličinu označovanou jako signál. Plamenový ionizační detektor je schopný detekovat většinu organických látek a citlivý je zejména na uhlovodíkové látky, u kterých je signál často úměrný počtu uhlíkových atomů. Termoionizační detektor je obdobou FID, díky přítomnosti keramického tělíska s obsahem Rb nebo Cs je selektivní k látkám obsahujícím N a P. Detektor elektronového zachytu využívá ionizace nosného plynu proudem elektronů emitovaných z radioaktivního  $\beta$  zářiče. Detektor je selektivní na látky obsahující elektronegativní atomy včetně halogenů, neboť tyto atomy zachycují elektrony a snižují velikost ionizačního proudu. Plamenový fotometrický detektor využívá faktu, že některé atomy jsou excitovány po rozkladu látky ve vodíkovém plamenu a následně emitují charakteristické záření. Detektor je citlivý zejména na látky obsahující S a P [49].

Signál z detektoru se zpracuje, zapíše a vyhodnotí počítačem, který má nainstalovaný speciální software. Měřený signál není pouze funkcí množství analytu, ale je sumou příspěvků analytu, matrice a přístroje [26].

Dávkovač, kolona a detektor vyžadují termostatování, tzn. regulaci teploty. Běžně se teplota pohybuje od 50 – 300 °C [26].

Výsledkem chromatografického procesu je chromatogram, který představuje závislost signálu na čase resp. na objemu mobilní fáze prošlé kolonou. Správná interpretace chromatogramu nám umožní získat všechny potřebné informace, kvalitativní i kvantitativní zastoupení složek vzorku a účinnost kolony [20], [26].





Obrázek č. 2.20: Schéma plynového chromatografu [20]

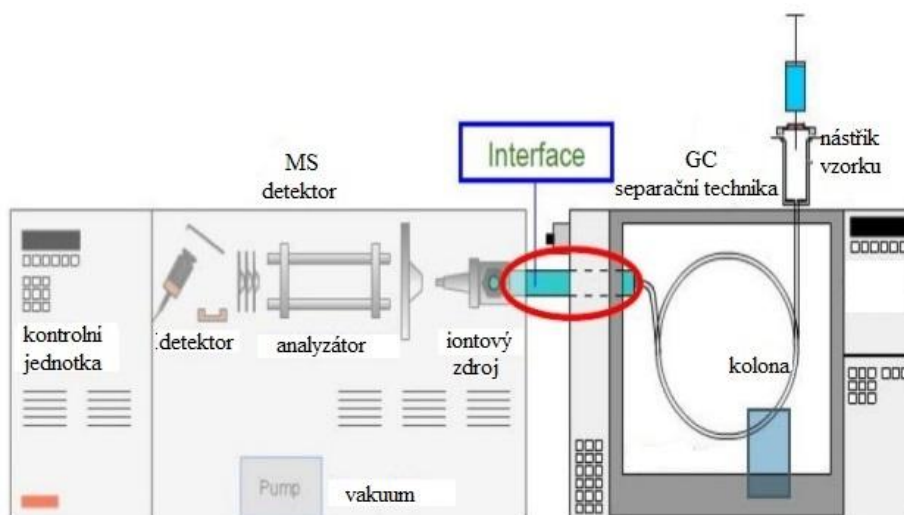
### **Plamenový ionizační detektor (FID)**

Požadavky na detektory jsou co nejnižší meze detekce, stabilita, maximální rychlost odezvy, minimální vnitřní objem. Plamenový ionizační detektor patří k nejrozšířenějším detektorům v plynové chromatografii. Jeho podstata spočívá v měření změny ionizačního proudu vodíko-vzduchového plamene způsobené přítomností eluovaného analytu. Je tvořen hořáčkem, do kterého ústí výstup z kolony a přívod vodíku. Nad ústím hořáčku je přívod vzduchu pro plamínek. Jednou elektrodou zpravidla bývá hořáček, druhá má tvar trubičky umístěné nad ním. Detekční objem plamenově ionizačního detektoru je malý (5 – 10  $\mu\text{l}$ ) a vhodný pro nejrůznější instrumentální uspořádání. Detektor nevykazuje selektivitu, je tedy univerzálním detektorem pro organické látky. Je charakteristický vysokou citlivostí, koeficientem linearit rovným jedné se širokým lineárním dynamickým rozsahem [20], [26].

### **2.6.2 Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC/MS)**

Metoda kombinuje vysokou účinnost kapilární plynové chromatografie s detekcí vysoce specifickou pro daný analyt a zároveň umožňující získání informace o struktuře neznámých látek. Strukturní informace je obsažena v hmotnostním spektru, kde je vynesena závislost efektivní hmotnosti ionizované částice -  $m/z$  na relativní intenzitě. Metoda je velmi účinná pro charakterizaci organických látek, nacházejících se i v komplikovaných směsích ve velmi rozdílném zastoupení [26].

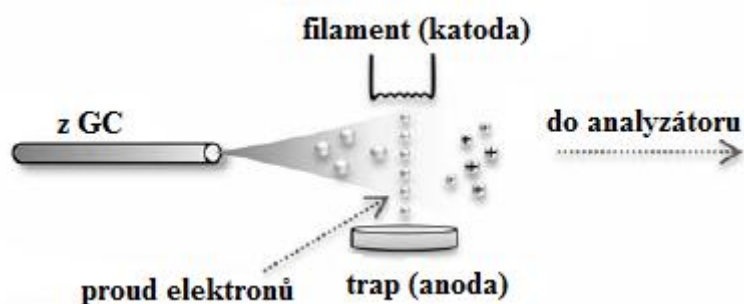
Základním předpokladem pro úspěšnou separaci iontů je vysoké vakuum (podle použitého analyzátoru iontů  $10^{-3}$  až  $10^{-5}$  Pa). Za těchto podmínek nedochází k výměně energie mezi jednotlivými částicemi jejich vzájemnými kolizemi [49].



Obrázek č. 2.21: Schéma GC/MS [26]

### ***Elektronová ionizace (EI)***

Nejčastěji používaný iontový zdroj pro plynné vzorky je elektronová ionizace. Tato technika je někdy označována jako „ionizace nárazem elektronu“. Principem je interakce elektronů urychlených na kinetickou energii 70 eV s neutrálními molekulami, při které dochází k vyražení elektronu z elektronového obalu molekuly za vzniku radikalkationtu, označovaného též jako molekulový ion. Nadbytek energie předaný při interakci pak vede k fragmentaci molekulového iontu za vzniku nabitých fragmentů a neutrálních ztrát. Vzhledem k velkému množství energie předávané při interakci s ionizujícím elektronem je elektronová ionizace považována za tvrdou ionizační techniku. Při EI jsou produkovány pouze kationty. Elektronová ionizace je dominující ionizační technikou při spojení GC/MS. Její velkou výhodou je možnost využití rozsáhlých knihoven hmotnostních spekter k identifikaci separovaných složek.[26].



Obrázek č. 2.22: Schéma elektronové ionizace [30]

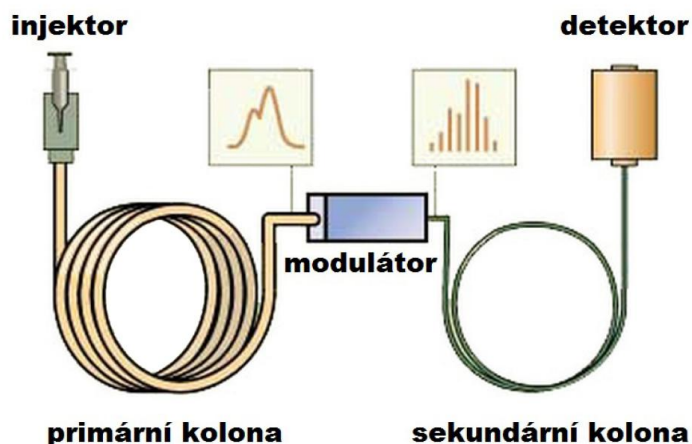
### ***GC/MS s trojitým kvadrupólem***

Hmotnostní separátor trojitý kvadrupól umožňuje detekci v režimu tandemové hmotnostní spektrometrie. Jeho nejsilnější stránkou je cílená detekce vybraných sloučenin v režimu MRM (Multiple Reaction Monitoring - sledování vybrané reakce) na stopové až ultrastopové úrovni. V principu jsou zde umístěny tři kvadrupóly, přičemž první a třetí

pracují jako hmotnostní analyzátoři. Mezi nimi je druhý kvadrupól, fungující jako kolizní cela (tento nemusí být na principu kvadrupólu), kde aplikací vyššího tlaku (přivádění kolizního plynu) a urychlení iontů elektrickým polem (dodání kolizní energie) dochází ke srážkám iontů letících z prvního kvadrupólu (prekurzorové ionty) s molekulami či atomy kolizního plynu (dusík, argon). Srážky vedou ke zvýšení vnitřní energie iontů a tím k jejich fragmentaci na specifické fragmenty, které vstupují následně do třetího kvadrupólu. Jedná se o tzv. kolizně indukovanou disociaci [26].

### 2.6.3 Kompletní dvojrozměrná plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GCxGC/TOF-MS)

Dvojrozměrná plynová chromatografie využívá dvě kolony spojené za sebou. Kolony jsou s odlišnou selektivitou, nejčastější první kolona je s nepolární stacionární fází a druhá kolona je s polární stacionární fází. V první dimenzi se složky vzorku separují podle bodů varu v podmínkách standardní chromatografické separace. V druhé dimenzi s kratší a užší kolonou, jsou látky během několika sekund děleny izotermně podle své polarizace. Mezi kolonami je umístěn modulátor, který cyklicky zachycuje malé frakce z eluátu z první dimenze a dává je do druhé. Nejpoužívanější typ modulátoru je dvoustupňový kryogenní modulátor se čtyřmi tryskami [51], [52], [53].



Obrázek č. 2.23: Zapojení modulátoru [50]

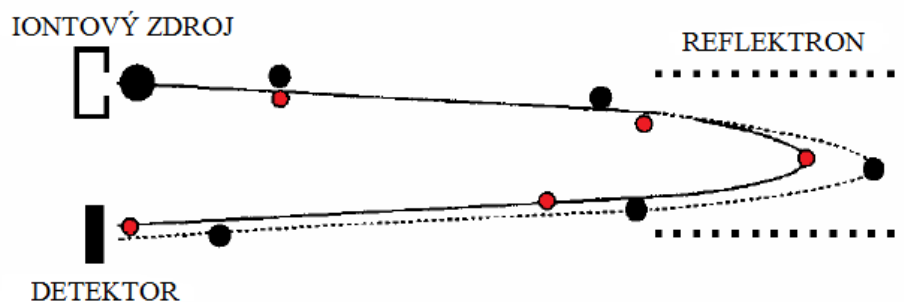
Výsledkem je kompletní separace vzorku dvěma odlišnými mechanismy, kterou je možno znázornit ve dvou dimenzích. Namísto klasického chromatogramu se pracuje s dvourozměrným vrstevnicovým diagramem, ve kterém X, Y pozice daného píku odpovídá jeho elučnímu času na první a na druhé koloně [51].

Hlavním přínosem dvourozměrné plynové chromatografie je vysoká píkova kapacita. Vhodné detektory jsou plamenový ionizační, detektor elektronového zachytu a fotoionizační. Z hmotnostní spektrometrie je vhodný analyzátor doby letu a s jistými omezeními i kvadrupól [51].

#### **Průletový analyzátor (TOF)**

Průletový separátor separuje ionty na základě rozdílné rychlosti pohybu iontů o různém

poměru  $m/z$ . Měří se doba, kterou ionty stráví v letové trubici na dráze k detektoru. Výrazného zvýšení rozlišení TOF bylo dosaženo použitím elektrostatického reflektoru (iontové zrcadlo). Tvoří jej soustava disků generujících rostoucí elektrostatické pole, jehož průletem se sníží rozptyl kinetické energie iontů o stejném  $m/z$ . Měření spektra je velice rychlé, trvá obvykle desetiny mikrosekund, neboť lze použít vysoká urychlovací napětí [49].

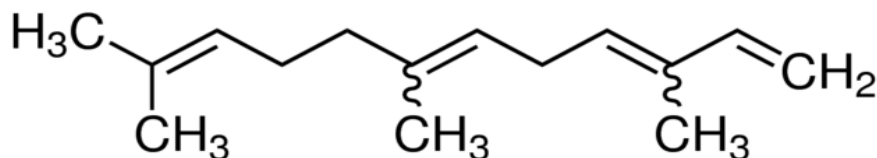


Obrázek č. 2.24: Analyzátor doby letu [49]

## 2.7 Charakteristika esenciálních olejů

### 2.7.1 Heřmánkový olej

Viskózní, inkoustově modrý esenciální olej je získáván z kvetoucích konců stonků destilací vodní parou. Nejvýznamnějšími a nejpoužívanějšími druhy v kosmetickém průmyslu jsou heřmánek pravý (*Matricaria chamomilla*), heřmánek římský (*Chamaemelum nobile*) a heřmánek divoký (*Ornithoglossum multicaulis*). Heřmánkový olej má intenzivní, kouřové, sladké, zelené a bylinné tóny s téměř ovocným, ale poněkud nahořklým podtónem. Přítomnost barviva azulenu, který heřmáнку dodává jeho sytě modrou barvu, činí tento esenciální olej silně protizánětlivým a antioxidačním. Po psychické stránce heřmánek uklidňuje, tiší deprese a mysl při vzplanutí zlosti. Mimo azulenu heřmánkový olej obsahuje také terpeny (–)- $\alpha$ -bisabolol, důležitý alkohol geraniol, farnesol, (–)- $\alpha$ -bisabololoxid A, nenasycené uhlovodíky farnesen a cadinen, heterocyklický aldehyd furfural. Bod varu je 140 °C [11], [13], [23], [43], [44].

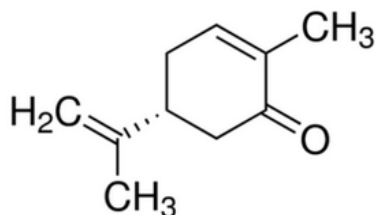


Obrázek č. 2.25: Seskviterpenický uhlovodík farnesen [13]

### 2.7.2 Máťový olej

Máťový olej je získáván z máty peprné (*Mentha piperita*), luční (*Mentha arvensis*) nebo kadeřavé (*Mentha spicata*), destilací vodní parou z květů a listů. Světle žlutozelený olej

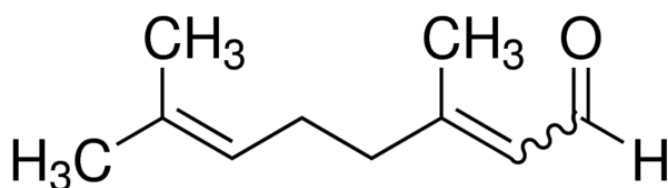
z máty kadeřavé má svěží, kořenité, bylinné tóny a sladké, travnaté podtóny. Významnou složkou pepermintového oleje je (–)-menthol. Využívá se z důvodu chladícího efektu a pro svou charakteristickou vůni. V mátě luční se nachází až 90 % této složky. Odhadovaná produkce této složky je 20 000 tun ročně, nemůže být tedy získávána pouze přírodní cestou. Mezi další významné složky mátového oleje patří kyslíkaté terpenoidy (–)-karvon, 1,8-cineol, optický izomer pinenu  $\alpha$ -pinen, cyklický terpen limonen, monoterpen menthon. Bod varu je 228 °C [13], [14], [23].



Obrázek č. 2.26: (–)-karvon [13]

### 2.7.3 Meduňkový olej

Esenciální olej se získává destilací vodní parou z květenství a listů meduňky lékařské (*Melissa officinalis*). Olej má teplé, čerstvé, citronové vysoké tóny a sladké, balzámové, bylinné podtóny. Meduňkový olej je jedním z nejlepších esenciálních olejů na léčbu šoku, deprese, zármutku a úzkosti. Povzbuzující účinky meduňky mají příznivý vliv na kardiovaskulární systém, snižují vysoký krevní tlak, zpomalují příliš rychlé dýchání, mírní stres, léčí nespavost a uvolňuje nervové napětí. Hlavními složkami jsou citral složený ze dvou stereoizomerů neralu (2Z) a geranialu (2E), dále alkohol linalool a citronelol [11], [23], [44].

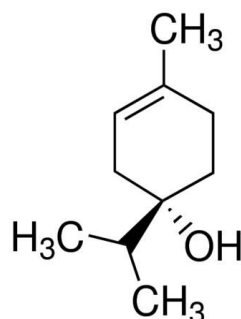


Obrázek č. 2.27: Aldehyd citral [13]

### 2.7.4 Levandulový olej

Levandulový olej je důležitou surovinou používanou především v kosmetickém průmyslu, kde se spotřeba pohybuje okolo 1000 tun ročně. Získává se především destilací vodní parou z květů levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*), levandule širokolisté (*Lavandula latifolia*) nebo levandule prostřední (*Lavandula intermedia*). Bezbarvý olej má čisté, svěží, květinové vysoké tóny, jemné, bylinné podtóny. Jeho kvalita i složení se liší druh od druhu. Často se používá při péči o pleť, v parfumerii, kde její svěží, květinová vůně působí uklidňujícím dojmem. Prozatím bylo v levandulovém oleji z levandule lékařské

identifikováno přes 300 sloučenin. Hlavními složkami jsou  $(-)$ -(*R*)-linalool, jeho množství tvoří 32 % z celkového objemu a  $(-)$ -(*R*)-linalylacetát, jehož množství činí 38 % z celkového objemu. U levandulového oleje získaného z levandule prostřední tzv. Lavandinu je procentuální složení hlavních složek odlišné. Množství  $(-)$ -(*R*)-linaloolu činí 32 % a  $(-)$ -(*R*)-linalylacetátu pouze 26 % z celkového objemu. Oproti tomu levandule širokolistá obsahuje pouze  $(-)$ -(*R*)-linalool, jeho množství tvoří 40 % z celkového objemu. Dalšími významnými složkami v levandulovém oleji, kde množství je různé a závisí na původu květů, jsou: kamfor, 1,8-cineol, alkohol  $(-)$ -(*R*)-lavandulol a jeho ester,  $(+)$ -(*S*)-terpinen-4-ol, alifatické  $C_8$  sloučeniny okt-1-en-3-ylacetát, oktan-3-on, okt-1-en-3-ol, seskviterpeny karyofylen, farnesen, germacren D. Třemi významnými monoterpeny, nacházejícími se v esenciálním oleji levandule širokolisté jsou cyklické ethery furan, perillen a neroloxid. Neméně významnými chemickými sloučeninami v esenciálním oleji jsou izomery linalooloxid a jejich oxidační produkty, například  $(+)$ -(*R*)-4-methyl-4-vinylbutyrollakton, nestabilní epoxidovaný derivát (3*R*)-6,7-epoxy-linalylacetát, derivát cyklobutanu pinonaldehyd, kyselina 2,2,3-trimethyl-3-en-1-octová a kyselina 2-[(1*S*)-2,2,3-trimethyl-4-oxocyclopentyl]octová. Levandulový olej je bohatý na seskviterpeny ve stopovém množství a metabolity. Z řady derivátů santalu, které jsou opačné optické série než v santalovém oleji, velkou pozornost vědců poutá  $(-)$ - $\alpha$ -santalen,  $\alpha$ -photosantalol B,  $\alpha$ -santalal, ekasantalal. Bylinný, dřevitý tón levandulového oleje způsobují methylvinylketon, (*E*)-ocimen, (*Z*)-ocimen, myrcen,  $\beta$ -farnesen a stereoizomer galbanolen. Květinovou vůni způsobují *cis*-jasmon, methyljasmonát,  $\beta$ -ionon a  $\beta$ -damascenon. Důležitými sloučeninami jsou i benzenoidní sloučeniny, například kumarin, methylsalicylát, *o*-hydroxycuminal, eugenol, guaiacol. Bod varu oleje je 204 °C [11], [13], [23].

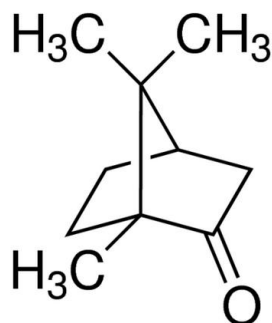


Obrázek č. 2.28:  $(+)$ -(*S*)-terpinen-4-ol [13]

### 2.7.5 Šalvějový olej

Bezbarvý olej s hořce bylinnou vůní s kafrovitými a kouřovými tóny se získává především destilací vodní parou ze šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*). Olej napomáhá posilovat cirkulaci energie a krve, imunitu, zmírňuje pocení, průjem, zlepšuje zažívání, posiluje nervy. V šalvějovém oleji bylo identifikováno přibližně 250 chemických sloučenin. Největší procentuální zastoupení má  $(-)$ -(*R*)-linalylacetát (67 %), (*R*)-linalool (16 %). Významné složky šalvějového oleje jsou seskviterpeny germacren D (4 %) a karyofylen (3 %), které se s ostatními stopovými sloučeninami podílejí na typické vůni šalvěje. Sloučeninami ve stopovém množství jsou dihydropyran, deriváty tetrahydrofuranu, izomery linalooloxidu v množství 2 %. Seskviterpen (3*R*,6*E*)-3,15-epoxykaryofyl-6-en má velmi příjemnou dřevitou vůni, která se v šalvějovém oleji vyskytuje relativně ve vysoké

koncentraci ( $< 0,4 \%$ ). Vedle charakteristické dřevité vůně seskviterpeny (+)-isospathulenol a (+)-spathulenol dodávají šalvějovému oleji zemitý tón. 1,5-epoxysalvial-4(14)-en je další důležitý kyslíkatý seskviterpen, který má lehce kořeněnou, květinovou vůni. Seskviterpenový alkohol (+)- $\alpha$ -bisabolol, který dodává farmakologický účinek heřmánkovému oleji a je také důležitou složkou šalvějového oleje. Ambrovou vůni šalvějového oleje prezentuje (–)-ambrox a bicyklohomofarnesal. Šalvějový olej obsahuje nejméně 2 % sclareolu, který je důležitou základní surovinou používanou při syntéze (–)-ambroxu v organické chemii. Bod varu je  $181\text{ }^{\circ}\text{C}$  [8], [11], [13], [23].



Obrázek č. 2.29: Monoterpen kamfor

## 2.8 Mikroskopické metody

Mikroskopické metody se vyvíjely postupně a v řadě případů byl jejich rozvoj podmíněn stavem vědy a techniky v daném časovém období. Mají své nezastupitelné místo v mnoha vědeckých oborech, přispěly k mnoha důležitým objevům, slouží k zobrazení struktur, které nejsou viditelné pouhým okem [34].

### 2.8.1 Optická mikroskopie

Optický mikroskop je zařízení pro pozorování struktury malých objektů využívající viditelného světla ( $400 - 700\text{ nm}$ ). Opticky se jedná o dvoustupňovou soustavu tvořenou objektivem a okulárem doplněnou osvětlovací soustavou, kdy světlo buď prochází pozorovaným objektem, nebo dopadá na povrch objektu. Moderní badatelské mikroskopy jsou vybaveny digitálními fotoaparáty pro mikrofotografii nebo mikrokinematografii. Optický mikroskop umožňuje měřit s několika různými kontrastními metodami, díky tomu existuje několik druhů mikroskopu využívajících odlišné zdroje k vytváření obrazu [34].

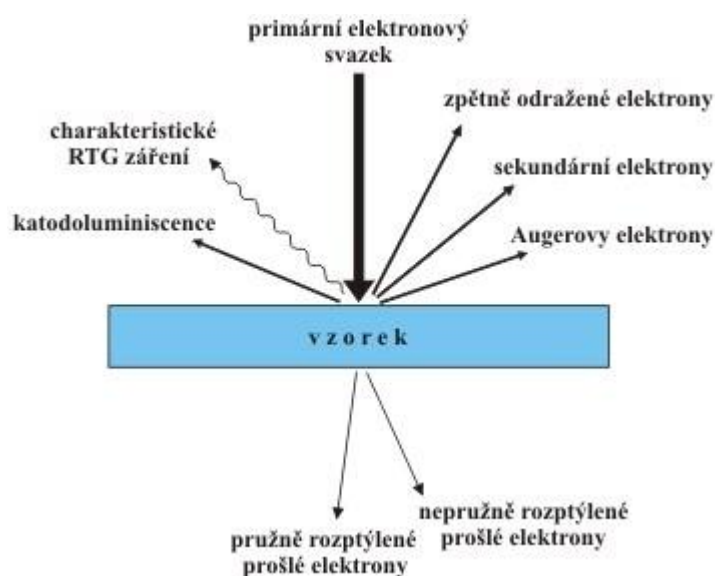
Mezi speciální optické mikroskopy patří stereomikroskop, který je vybaven dvěma okuláry. Nedosahuje velkého rozlišení, ale poskytuje velký pracovní prostor. Podle osvětlení okolí objektu je pozorování děleno na pozorování ve světlém poli, kdy objekt má tmavý obrys a nalézá se ve světlém poli nebo ve tmavém poli, kdy světlý objekt se nachází v tmavém poli. Mikroskop s fázovým kontrastem slouží ke zvýraznění kontrastu malých fázových objektů, u nichž detaily se absorpcí neliší od okolí, ale způsobují změnu fáze. Fluorescenční mikroskop je založen na schopnosti některých látek emitovat viditelné světlo po ozáření světlem o kratší vlnové délce. Takovýto postup se využívá k identifikaci organických látek

v horninách. Polarizační mikroskopie je kombinací světelného mikroskopu a polarimetru. Své využití nachází u vzorků s opticky aktivní oblastí nebo anizotropní oblastí [34].

## 2.8.2 Elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie je užitečný nástroj k pozorování a pochopení nano- a mikrosvěta. Pomocí elektronové mikroskopie lze zobrazit a analyzovat povrch i vnitřní strukturu, zkoumat krystalografii i chemické složení vzorku. V porovnání s optickým mikroskopem, ve kterém se využívá proud fotonů procházející skrz soustavu čoček, jsou zde využity elektrony procházející elektromagnetickými čočkami, což jsou cívky vytvářející vhodně tvarované magnetické pole, čím je dosaženo výrazně vyšší rozlišovací schopnosti. Zdrojem elektronů je elektronová tryska, popř. elektronové dělo. Elektrony vznikají emisí z katody a směrem k anodě jsou urychlovány urychlovacím napětím, aby získaly potřebnou energii. Celý děj probíhá ve vakuu, díky němuž se zvyšuje účinný průřez. Elektronové trysky lze rozdělit na termoemisní a autoemisní. U termoemisní dochází k zahřívání katody, což vede k nárůstu její vnitřní energie. Překročením tzv. mezní teploty dochází k emisi elektronů z povrchu zahřáté katody. Pro katodu se používají materiály jako wolframové vlákno nebo krystal hexaboridu lanthanu. U autoemisní má katoda tvar hrotu, kde v jejím okolí vzniká silné elektrické pole, které je schopné vytrhávat elektrony z povrchu hrotu. Využívá se monokrystal wolframu [31], [32].

V případě elektronové mikroskopie dochází k interakci primárních elektronů se vzorkem, nastávají pružné a nepružné rozptyly. Výsledkem je široké spektrum signálů, ze kterého lze získat řadu informací o povaze vzorku [31].



Obrázek č. 2.30: Signály vznikající při dopadu elektronů na vzorek [33]

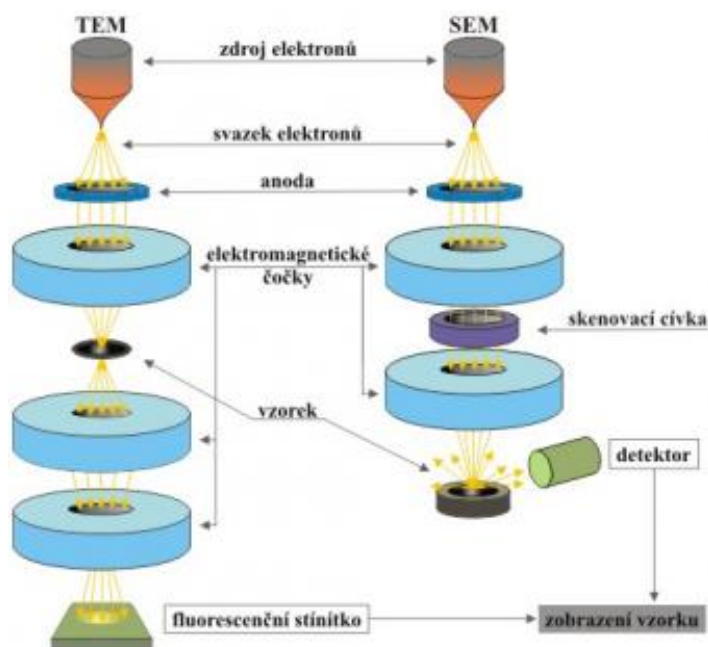
Mezi základní elektronové mikroskopy patří rastrovací elektronový mikroskop (SEM) a transmisní elektronový mikroskop (TEM). Transmisní elektronová mikroskopie je založena na detekci elektronů prošlých skrz zkoumaný vzorek. Zkoumaný vzorek je umístěn na fotoluminiscenčním stínítku. Pomocí prošlých elektronů získáme informaci o vnitřní struktuře vzorku na rozdíl od SEM, kdy získáme informaci o zobrazení povrchu vzorku nejčastěji



pomocí sekundárních elektronů [31].

### ***Rastrovací elektronová mikroskopie***

Působením urychleného primárního elektronového svazku na vzorek, ve směru řádek po řádku dochází k ovlivnění tvaru oblasti pod povrchem vzorku. Zde se začnou náhodně pohybovat primární elektrony, nastává pružný a nepružný rozptyl. Na základě svého chaotického pohybu elektrony generují signály, jejichž matematickou úpravou lze získat informace o povrchu vzorku. Využití paprsku elektronů umožňuje docílit vysokého zvětšení rozlišovací schopnosti. Rovněž hloubka ostroty je ve srovnání se světelnou mikroskopií lepší, a vzorky tak mohou být pozorovány ve 3D. Zkoumaný vzorek musí být nejprve dehydratován a posléze pokoven. Pozorování objektů probíhá za vysokého vakua, vzorky proto musí být připraveny tak, aby se zabránilo kolapsu křehkých tenkostěnných pletiv (pomocí vymrazování, superkritického vysoušení a aplikace různých chemických fixativ před dehydratací vzorku). V současnosti se využívají i moderní varianty SEM, takzvaná Environmentální SEM, umožňující pozorování hydratovaných, živých vzorků, nebo Kryo SEM, využívající zmrazené hydratované vzorky [32], [33], [48].



*Obrázek č. 2.31: Schéma transmisního a rastrovacího elektronového mikroskopu [33]*

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Vzorky rostlinného materiálu

- Heřmánek pravý
- Levandule lékařská
- Máta kadeřavá
- Meduňka lékařská
- Šalvěj lékařská

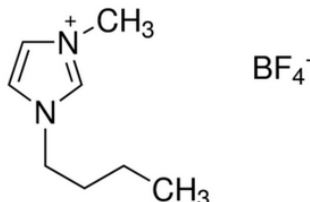
##### 3.1.1 Sběr, úprava rostlin před použitím

Sběr proběhl v roce 2016 v Ostré, okres Lysá nad Labem. Rostliny byly následně sušeny v sušárně s nucenými odvlhčovači při teplotě  $\pm 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2 Chemikálie, laboratorní vybavení, zařízení a přístroje

##### 3.2.1 Chemikálie

- Ethylacetát  $\geq 99,7\%$  Chromasolv<sup>®</sup>,  $T_v = 77\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\rho = 0,9\text{ g/cm}^3$  při  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , CAS: 141-78-6, Sigma-Aldrich
- Síran sodný bezvodý p.a., CAS: 7757-82-6, PENTA, Praha
- Ethanol absolutní,  $T_v = 78\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\rho = 0,789\text{ g/cm}^3$  při  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , CAS: 64-17-5, Sigma-Aldrich
- Methanol HPLC,  $T_v = 64,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\rho = 0,7918\text{ g/cm}^3$  při  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , CAS: 67-56-1, J.T.Baker<sup>®</sup>
- Demineralizovaná voda
- 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate  $\geq 98\%$ ,  $\rho = 1,21\text{ g/mL}$  při  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $M_r = 226,02\text{ g/mol}$ , CAS: 174501-65-6, Sigma-Aldrich



Obrázek č. 3.1: 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborát

- Hydromatrix Bulk Material, P/N 198003, CAS: 68855-54-9, (Agilent Technologies, USA)

### **3.2.2 Laboratorní vybavení**

- Laboratorní sklo
- Analytické váhy HR-120-EC (A&D Instruments, Japonsko)
- Předvážky Saltec SPB 52
- Stříkačkový filtr Cronus Nylon o průměru 4 mm a porozitě 0,20  $\mu\text{m}$ , Cronus Nylon o průměru 25 mm a porozitě 0,45  $\mu\text{m}$

### **3.2.3 Laboratorní zařízení, přístroje, software**

- Aparatura na destilaci vodní parou
- Milli-Q®, Millipore, porozita 0, 22  $\mu\text{m}$
- Teson 4 – ultrazvuková lázeň, Tesla
- Mikrovlnná extraktor Multiwave 3000 SOLV, Anton Paar
- Tlakový extraktor *one* – PSE (Applied Separations, USA)
- Hewlett Packard 5890 Series II Plus Gas Chromatograph
- Plynový chromatograf Bruker EVOQ™ GC Triple Quadrupole (TQ) s MS detekcí a autosamplerem CP-8400
- Plynový chromatogram LECO PEGASUS IV GCxGC/TOF-MS.
- Rastrovací elektronový mikroskop ZEISS EVO LS 10
- Microsoft Windows XP, Microsoft Office Excel 2007

## **3.3 Pracovní postupy, podmínky separačních metod**

### **3.3.1 Destilace vodní parou (DvP)**

Destilací vodní parou byly získány esenciální oleje, které byly následně vysušeny bezvodým síranem sodným a zředěny ethylacetátem. Vzorky byly přeneseny pomocí pipet do 2 ml vialek. Připravené vzorky byly uskladněny v suchu, temnu a chladnu při 3 °C. Následně nastříkovány do GC-FID, GC/MS, GCxGC/TOF-MS. Po ukončení destilace byl odebrán vzorek rostlinného materiálu pro rastrovací elektronovou mikroskopii.



Obrázek č. 3.2: Aparatura na destilaci vodní parou

#### ***Podmínky pro destilaci vodní parou***

- Množství rostlinného materiálu: 200 g
- Doba destilace: 40 minut
- Teplota destilace: 97 °C

#### ***Označení vzorků***

- Heřmánek pravý: HP\_DvP
- Levandule lékařská: LL\_DvP
- Máta kadeřavá: MK\_DvP
- Meduňka lékařská: ML\_DvP
- Šalvěj lékařská: SL\_DvP

### **3.3.2 Ultrazvuková extrakce (UE)**

Metodou byly získány extrakty za použití ethylacetátu a 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborátu, jako extrakčního činidla. Extrakty byly vysušeny bezvodým síranem sodným, následně přefiltrovány stříkačkovými filtry o porozitě 0,45  $\mu\text{m}$  a 0,20  $\mu\text{m}$ . Extrakt byl přenesen pomocí pipety do 2 ml vialky. Připravené vzorky byly uskladněny v suchu, temnu a chladnu při 3 °C pro nástřik do GC-FID, GC/MS a GCxGC/TOF-MS. Po dokončení extrakce byl odebrán vzorek rostlinného materiálu pro rastrovací elektronovou mikroskopii.



Obrázek č. 3.3: Ultrazvuková lázeň

#### ***Podmínky pro ultrazvukovou extrakci***

- Množství rostlinného materiálu: 600 mg
- Rozpouštědlo: ethylacetát, 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborát o objemu 5 ml
- Doba extrakce: 20 minut
- Teplota extrakce: 45 °C

#### ***Označení vzorků***

- Heřmánek pravý: HP\_UE
- Levandule lékařská: LL\_UE
- Máta kadeřavá: MK\_UE
- Meduňka lékařská: ML\_UE
- Šalvěj lékařská: SL\_UE
- Meduňka lékařská: ML\_UE\_IL

### **3.3.3 Mikrovlnná extrakce (MAE)**

Do teflonových extrakčních patron bylo kvantitativně převedeno vždy 5 g rostlinného materiálu a přidáno rozpouštědlo. Do rotoru bylo umístěno 8 patron, vč. patrony pouze s rozpouštědlem osazené teplotním čidlem. Získané extrakty byly vysušeny bezvodým síranem sodným, následně přefiltrovány stříkačkovým filtrem o porozitě 0,45 µm a 0,20 µm. Extrakt byl přenesen pomocí pipety do 2 ml vialky. Připravené vzorky byly uskladněny v suchu, temnu a chladnu při 3 °C pro nástřik do GC-FID, GC/MS a GCxGC/TOF-MS. Po dokončení extrakce byl odebrán vzorek rostlinného materiálu pro rastrovací elektronovou mikroskopii.



Obrázek č. 3.4: Přístroj pro mikrovlnnou extrakci (MAE)

#### ***Podmínky pro mikrovlnnou extrakci***

- Množství rostlinného materiálu: 5 g
- Rozpouštědla: ethylacetát, 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborát o objemu 30 ml
- Doba extrakce: 20 minut
- Teplota a výkon: 100 °C a 800 W
- Doba chlazení: 15 minut
- Rotor: SOLV MF-T8

#### ***Označení vzorků***

- Heřmánek pravý: HP\_MAE
- Levandule lékařská: LL\_MAE
- Máta kadeřavá: MK\_MAE
- Meduňka lékařská: ML\_MAE
- Šalvěj lékařská: SL\_MAE
- Meduňka lékařská: ML\_MAE\_IL

#### **3.3.4 Extrakce podporovaná tlakem (PSE)**

Rostlinný materiál byl rozetřen v třecí misce s tloučkem s hydromatrixem v poměru 1:1. Tato směs byla za průběžného sklepávání vsypána do kovové extrakční patrony o objemu 33 ml. Zbytek patrony byl vyplněn pouze hydromatrixem až cca 1 cm pod okraj. Nahoru i vespod patrony byl umístěn filtrační papír. Získané extrakty tímto způsobem byly vysušeny bezvodým síranem sodným, následně přefiltrovány stříkačkovým filtrem o porozitě 0,45 µm a 0,20 µm. Extrakt byl přenesen pomocí pipety do 2 ml vialky. Připravené vzorky byly uskladněny v suchu, temnu a chladnu při 3 °C pro nástřik do GC-FID, GC/MS, GCxGC/TOF-MS. Po dokončení extrakce byl odebrán vzorek rostlinného materiálu pro rastrovací elektronovou mikroskopii.



*Obrázek č. 3.5: Přístroj pro tlakovou extrakci rozpouštědlem (PSE)*

***Podmínky pro tlakovou extrakci rozpouštědlem***

- Množství rostlinného materiálu: 3,5 g
- Rozpouštědla: ethylacetát, 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborát
- Teplota a tlak: 100 °C a 140 bar
- Počet cyklů: 2
- Doba statické fáze: 5 minut
- Proplach patrony: 20 sec
- Použitý plyn: dusík
- Doba extrakce: 10 minut

***Označení vzorků***

- Heřmánek pravý: HP\_PSE
- Levandule lékařská: LL\_PSE
- Máta kadeřavá: MK\_PSE
- Meduňka lékařská: ML\_PSE
- Šalvěj lékařská: SL\_PSE
- Meduňka lékařská: ML\_PSE\_IL

### **3.4 Podmínky analytických metod**

#### **3.4.1 GC-FID**

- Plynový chromatograf: HP 5890 Serie II
- Nástřikové zařízení: Autosampler HP 7673A. Mikrostríkačka o objemu 10 µl (Agilent Technologies, USA)

- Množství dávkovaného vzorku: 1  $\mu\text{l}$
- Teplota injektoru: 260  $^{\circ}\text{C}$ , dělicí poměr 1:50
- Teplotní program kolony: 50  $^{\circ}\text{C}$  1 minutu, gradient 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  do 200  $^{\circ}\text{C}$ , izoterma 1 min
- Kolona: DB-5 MS 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$
- Nosný plyn:  $\text{H}_2$  (SIAD, čistota 5.5), průtok 1,2 ml/min (konstantní průtok)
- Detektor: plamenový ionizační detektor (FID)
- Teplota detektoru: 200  $^{\circ}\text{C}$
- Průtok plynů do detektoru:  $\text{H}_2$  44 ml/min, vzduchu 340 ml/min, make-up (dusík) 27,6 ml/min

### 3.4.2 GC/MS

- Přístroj: Bruker EVOQ GC/QQQ
- Injektor: CP 8200
- Dávkování: 1  $\mu\text{l}$  s děličem (dělicí poměr 1:50)
- Teplota injektoru: 250  $^{\circ}\text{C}$
- Teplotní program kolony: 80  $^{\circ}\text{C}$  1 minutu, gradient 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  do 280  $^{\circ}\text{C}$ , izoterma 1 min
- Kolona: SLB<sup>TM</sup> – 5MS (Supelco USA), 60 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$
- Nosný plyn: He (SIAD, čistota 6.0)
- Iontový zdroj: EI, energie elektronů 70 eV
- Teplota iontového zdroje: 280  $^{\circ}\text{C}$
- Doba analýzy: 46 minut

### 3.4.3 GCxGC/TOF-MS

#### *Nastavení plynového chromatografu*

- Nástřikové zařízení: Autosampler Agilent 7683 A, mikrostřikačka o objemu 5  $\mu\text{l}$ .
- Dávkování: 0,1  $\mu\text{l}$ , 0,5  $\mu\text{l}$ , 1  $\mu\text{l}$  s děličem (dělicí poměr 1:100)
- Teplota injektoru: 250  $^{\circ}\text{C}$
- Teplotní program primární kolony: 80 po dobu 1 minuty, 5  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  do 280  $^{\circ}\text{C}$ , finální izoterma 11 minut
- Teplotní program sekundární kolony: + 5  $^{\circ}\text{C}$  nad primární kolonou
- Primární kolona: Rxi-5ms, 29 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ . Stacionární fáze složená z 5 % difenylu a 95 % dimethyl polysiloxanu
- Sekundární kolona: BPX-50, 1,5 m x 0,1 mm x 0,1  $\mu\text{m}$ . Stacionární fáze složena z fenyl polysilfenylen-siloxanu
- Nosný plyn: He, průtok 1,5 ml.min<sup>-1</sup> (konstantní průtok)



- Teplota modulátoru: + 15 °C nad primární kolonou
- Teplota mezičlenu (transfer line): 280 °C

#### ***Nastavení hmotnostního spektrometru***

- Iontový zdroj: EI
- Teplota iontového zdroje: 250 °C
- Ionizační energie: – 70 eV
- Napětí detektoru: 1800 V
- Detektor: analyzátor doby letu (TOF)
- Rozsah sledovaných m/z: 50 – 550
- Frekvence snímání spekter: 200 spekter za sekundu
- Doba analýzy: 45 minut

### **3.5 Podmínky mikroskopických metod**

#### **3.5.1 SEM**

##### ***Naprašování vzorku***

- Naprašovací zařízení: Polaron Range SC 7640, tenká vrstva Au 10 - 20 nm
- Plyn: Argon
- Elektrické napětí: 1,5 kV
- Elektrický proud: 14 mA

##### ***Nastavení SEM***

- Elektronový zdroj: Termoemisní zdroj wolframové vlákno
- Pracovní vzdálenost: 9 mm
- Urychlovací napětí elektronů: 10 kV
- Proud primárního svazku: 80 pA

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Jedním z hlavních cílů této práce je zvolení optimální metody izolace vonných látek z vybraných přírodních materiálů, na základě výsledků literární rešerše a s přihlédnutím k vybavení laboratoří ÚCHTOŽP. Následně provést izolaci vonných látek a pomocí separačních technik ve spojení s hmotnostní spektrometrií charakterizovat složení získaných směsí.

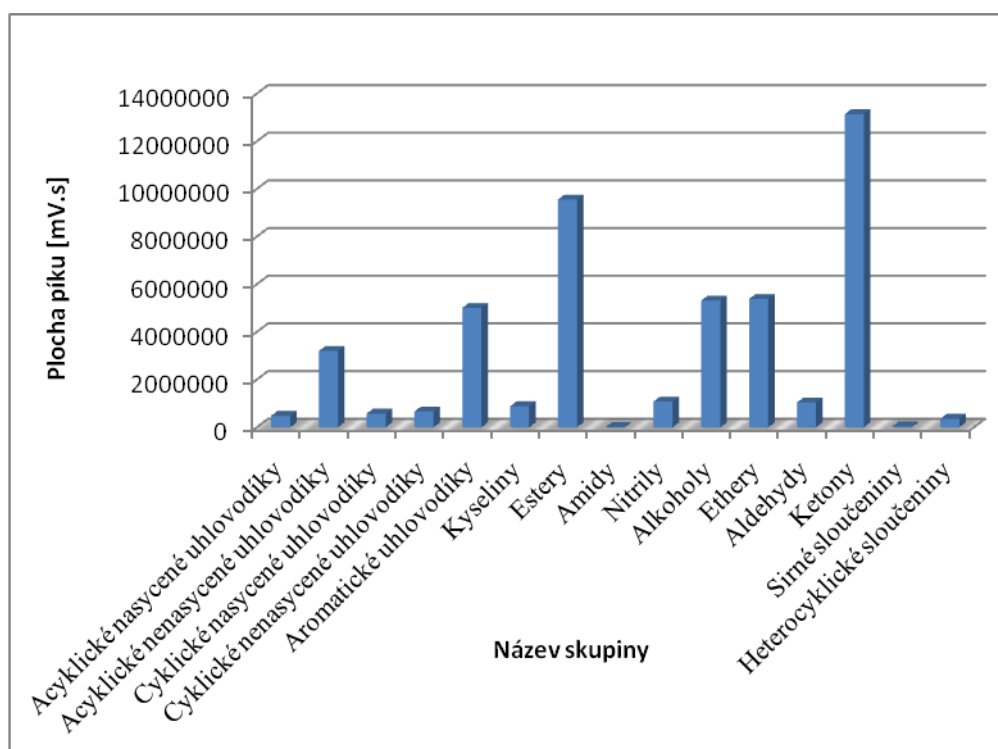
### 4.1 Identifikace a kvantifikace vonných látek metodou GCxGC/TOF-MS

Jako vzorky ke stanovení vonných látek sloužilo celkem 5 rostlinných druhů. Z každého vzorku byly izolovány vonné látky pomocí zvolených separačních metod. Získané extrakty byly nejdříve proměřeny pomocí metody GC-FID, za účelem zjištění přítomnosti vonných látek v extraktech. Kvalitativní analýza sloučenin tvořících analyzovanou směs byla provedena metodou GCxGC/TOF-MS. Identifikace byla prováděna automaticky během zpracování dat v následujících krocích: nalezení píku, výpočet a dekonvoluce hmotnostního spektra a hledání v knihovně spekter pomocí NIST knihovny. Identifikace získaných složek ultrazvukovou, mikrovlnnou extrakcí a tlakovou extrakcí rozpouštědlem byla bez dostačujících výsledků.

Tabulky stanovených chemických sloučenin jsou uvedeny v *příloze I*. Pro semi-kvantitativní vyhodnocení sledované látky sloužila plocha chromatografického píku. Výsledky jsou uvedeny v *tabulkách 4.1 – 4.10*. Grafické znázornění četnosti pozorovaných skupin bylo zobrazeno sloupcovým grafem. Chromatogramy jednotlivým extraktů jsou uvedeny v *obrázcích 4.1 – 4.5*.

*Tabulka č. 4.1: Zastoupení chemických skupin v heřmánkovém extraktu získaném destilací vodní parou*

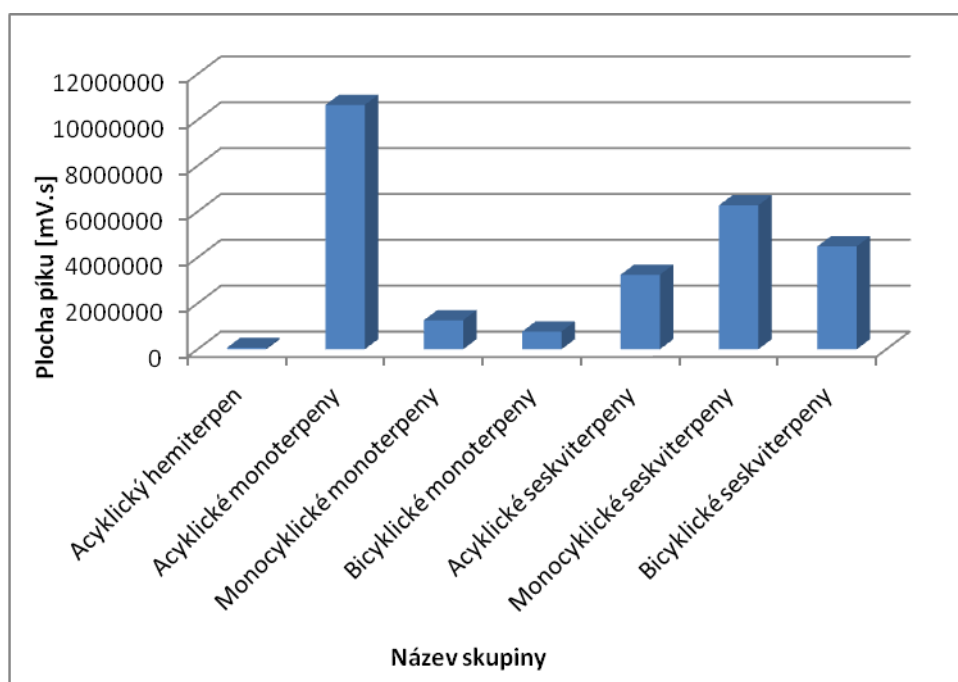
Název skupiny	Plocha píku [mV.s]
Acyklické nasycené uhlovodíky	483326
Acyklické nenasycené uhlovodíky	3202462
Cyklické nasycené uhlovodíky	577771
Cyklické nenasycené uhlovodíky	664306
Aromatické uhlovodíky	5008776
Kyseliny	882673
Estery	9556801
Amidy	16286
Nitrily	1080714
Alkoholy	5321414
Etery	5386860
Aldehydy	1039353
Ketony	13139149
Sírné sloučeniny	43649
Heterocyklické sloučeniny	360881



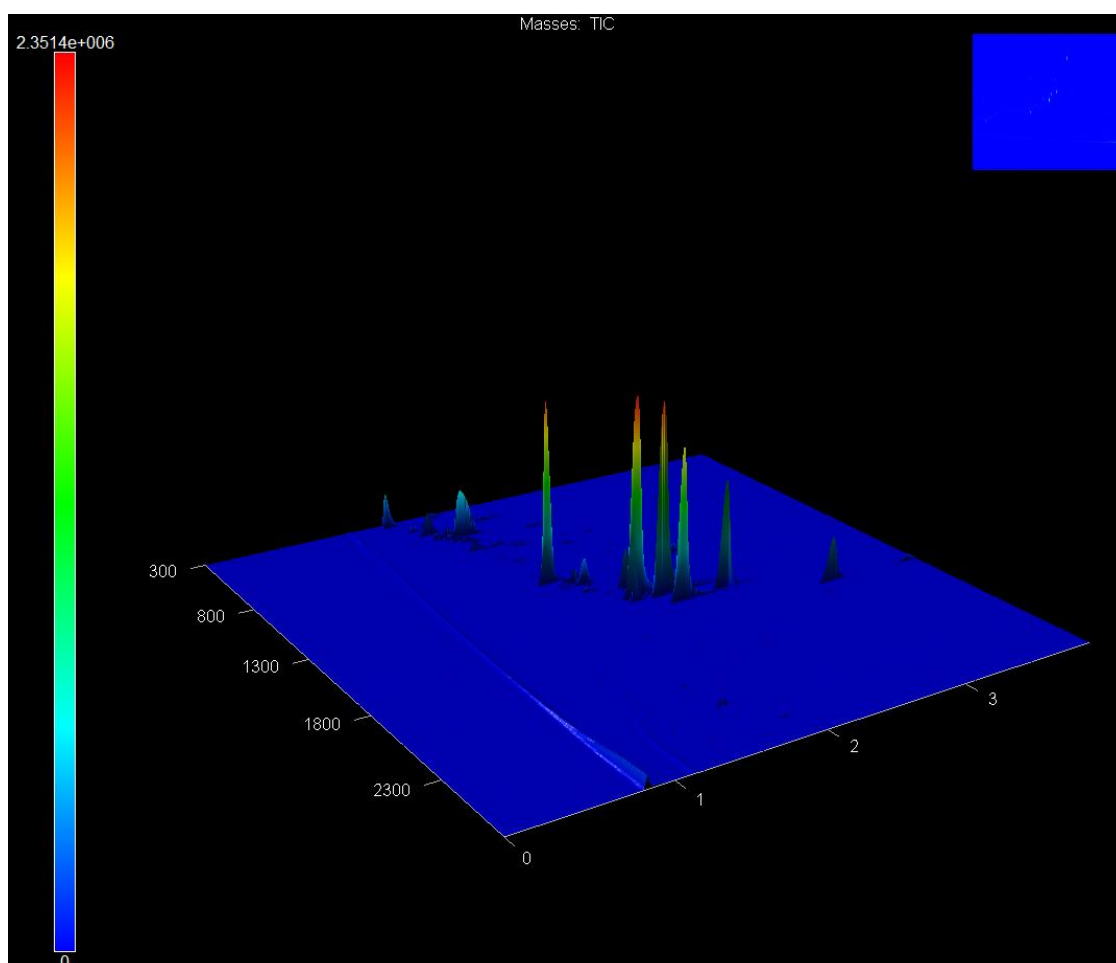
Graf č. 4.1: Grafické znázornění chemických skupin v heřmánkovém extraktu získaném destilací vodní parou

Tabulka č. 4.2: Zastoupení terpenů v heřmánkovém extraktu získaném destilací vodní parou

Terpeny	Plocha píku [mV.s]
Acyklický hemiterpen	69045
Acyklické monoterpeny	10655303
Monocyklické monoterpeny	1265738
Bicyklické monoterpeny	775729
Acyklické seskviterpeny	3250373
Monocyklické seskviterpeny	6281114
Bicyklické seskviterpeny	4489148



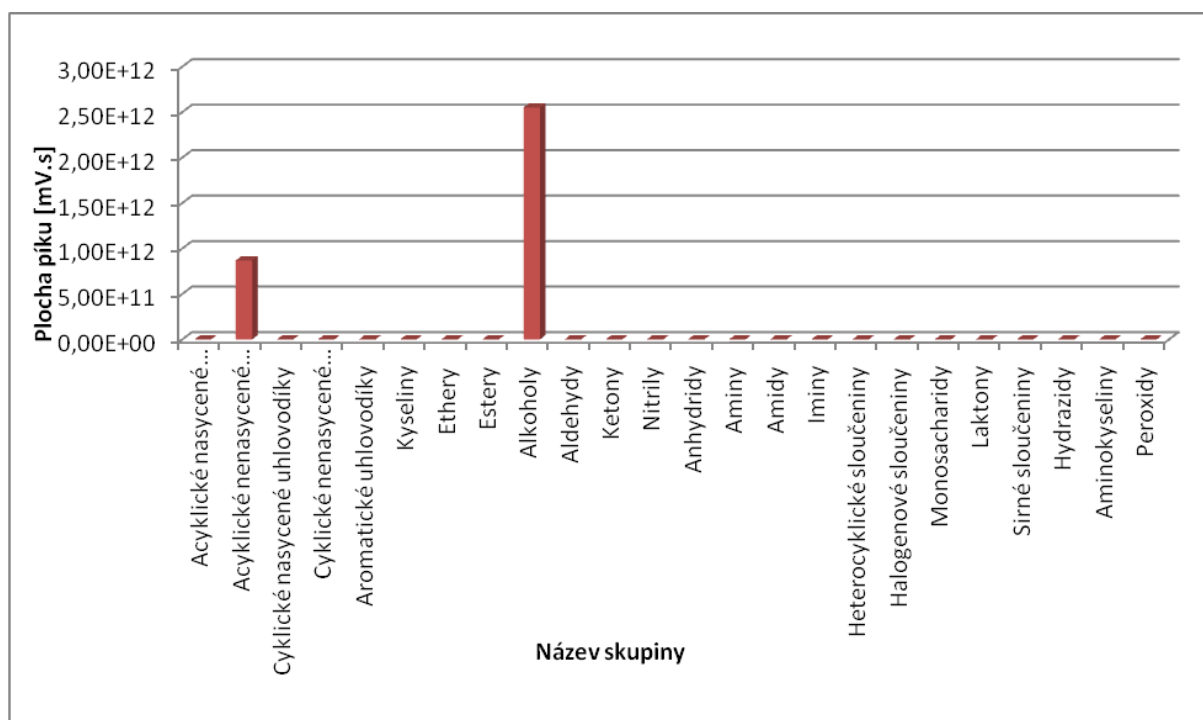
Graf. č. 4.2: Grafické znázornění zastoupení terpenů v heřmánekovém extraktu získaném destilací vodní parou



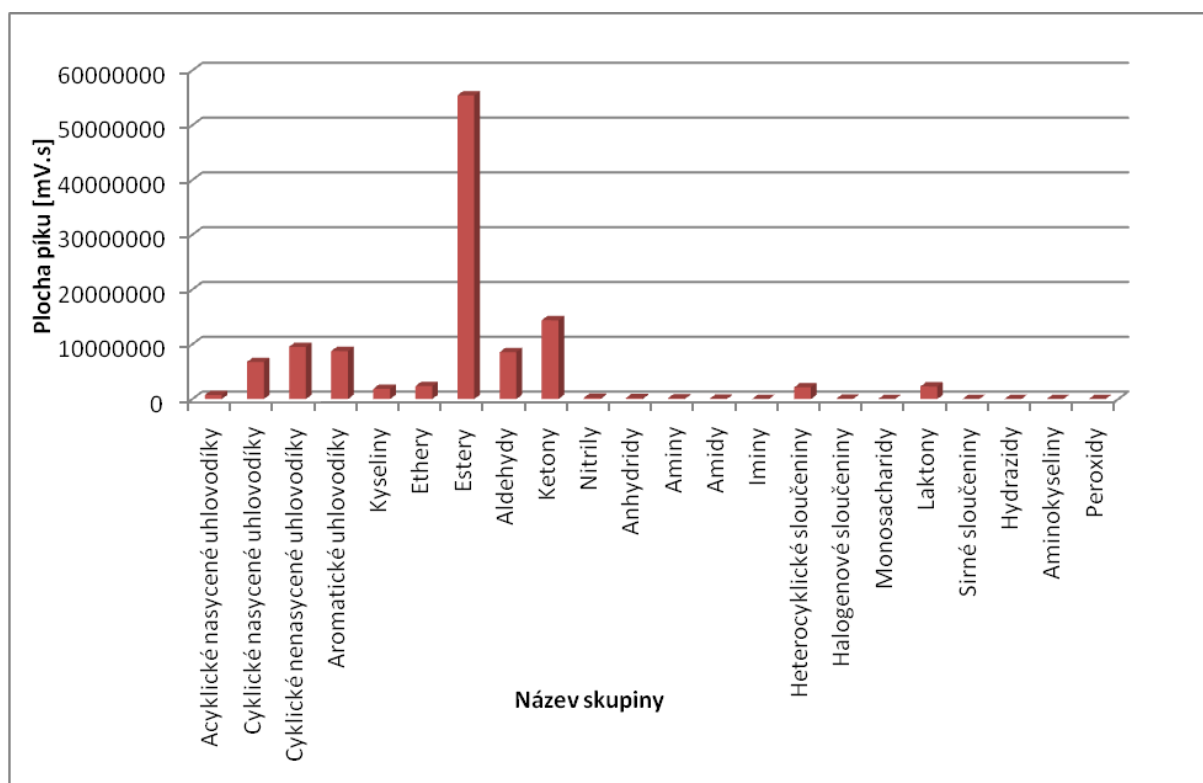
Obrázek č. 4.1: 3D chromatogram heřmánekového extraktu získaném destilací vodní parou

*Tabulka č. 4.3: Zastoupení chemických skupin v levandulovém extraktu získaném destilací vodní parou*

<b>Název skupiny</b>	<b>Plocha píku [mV.s]</b>
Acyklické nasycené uhlovodíky	7367545
Acyklické nenasyčené uhlovodíky	868752250641
Cyklické nasycené uhlovodíky	67835135
Cyklické nenasyčené uhlovodíky	95377863
Aromatické uhlovodíky	87606932
Kyseliny	18710136
Ethery	23668551
Estery	554530851
Alkoholy	2551043121993
Aldehydy	85590742
Ketony	143826267
Nitrily	2219045
Anhydridy	1801177
Aminy	1491790
Amidy	952997
Iminy	240486
Heterocyklické sloučeniny	21523560
Halogenové sloučeniny	541504
Monosacharidy	231305
Laktony	22961637
Sírné sloučeniny	34475
Hydrazidy	181031
Aminokyseliny	37322
Peroxidy	36538



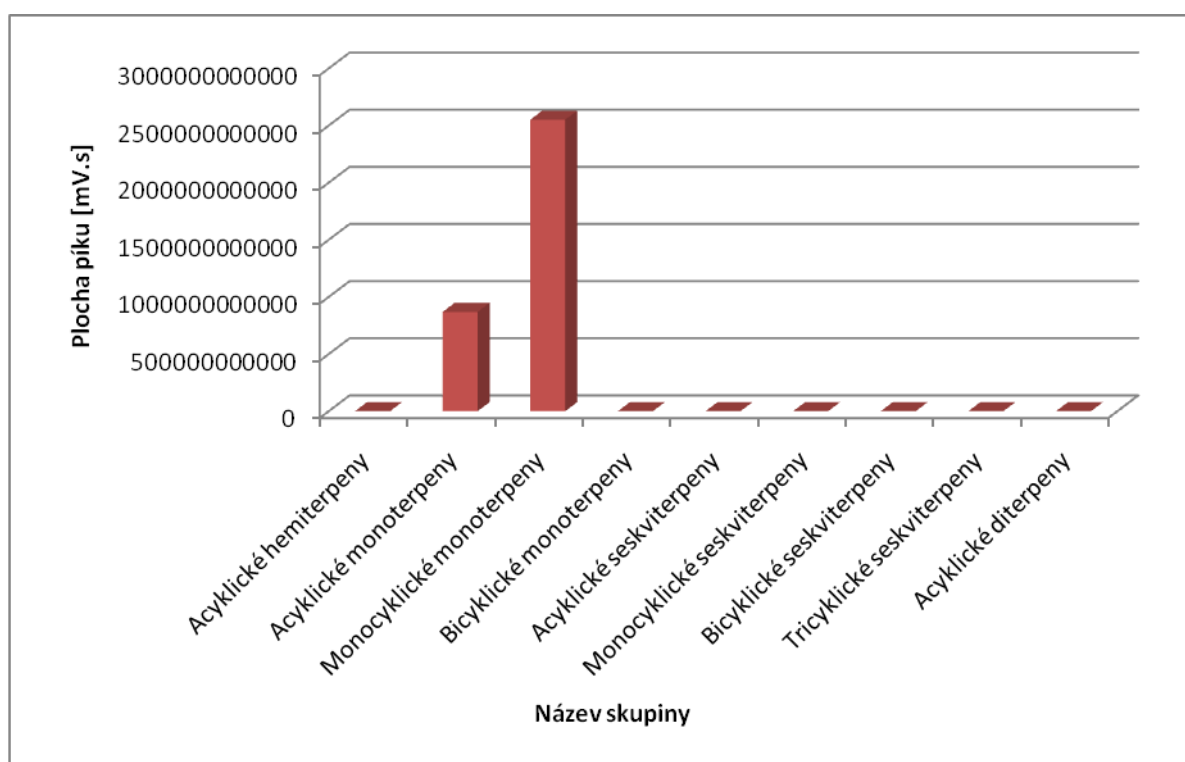
Graf č. 4.3.1: Grafické znázornění chemických skupin v levandulovém extraktu získaném destilací vodní parou



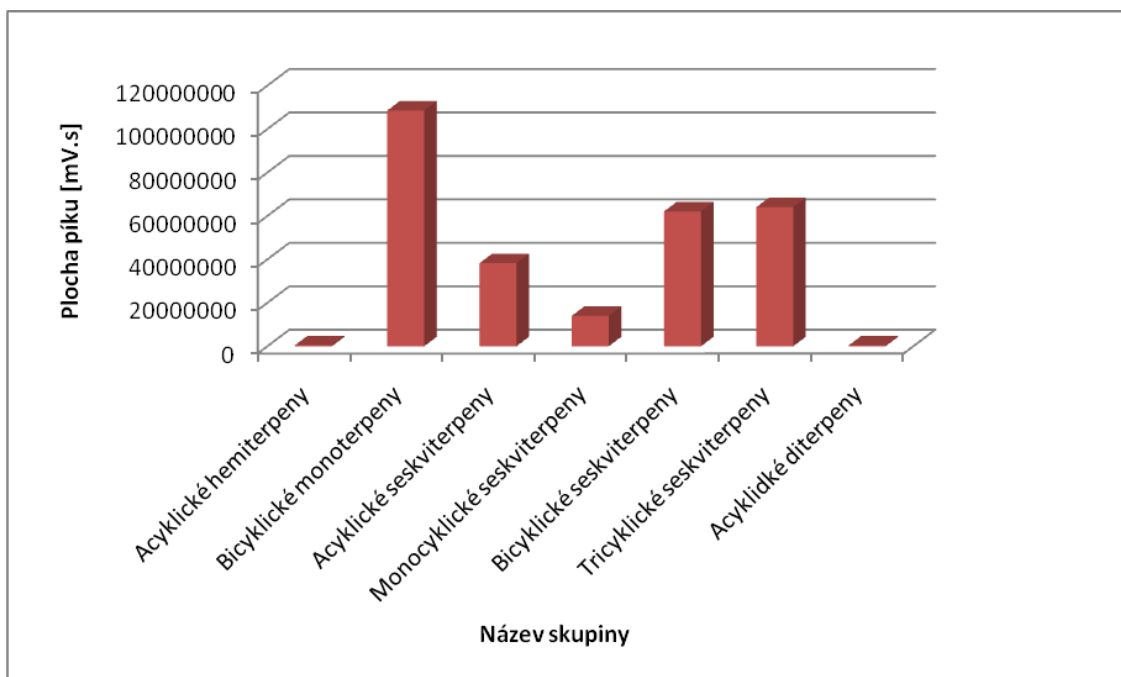
Graf č. 4.3.2: Grafické znázornění chemických skupin v levandulovém extraktu získaném destilací vodní parou

Tabulka č. 4.4: Zastoupení terpenů v levandulovém extraktu získaném destilací vodní parou

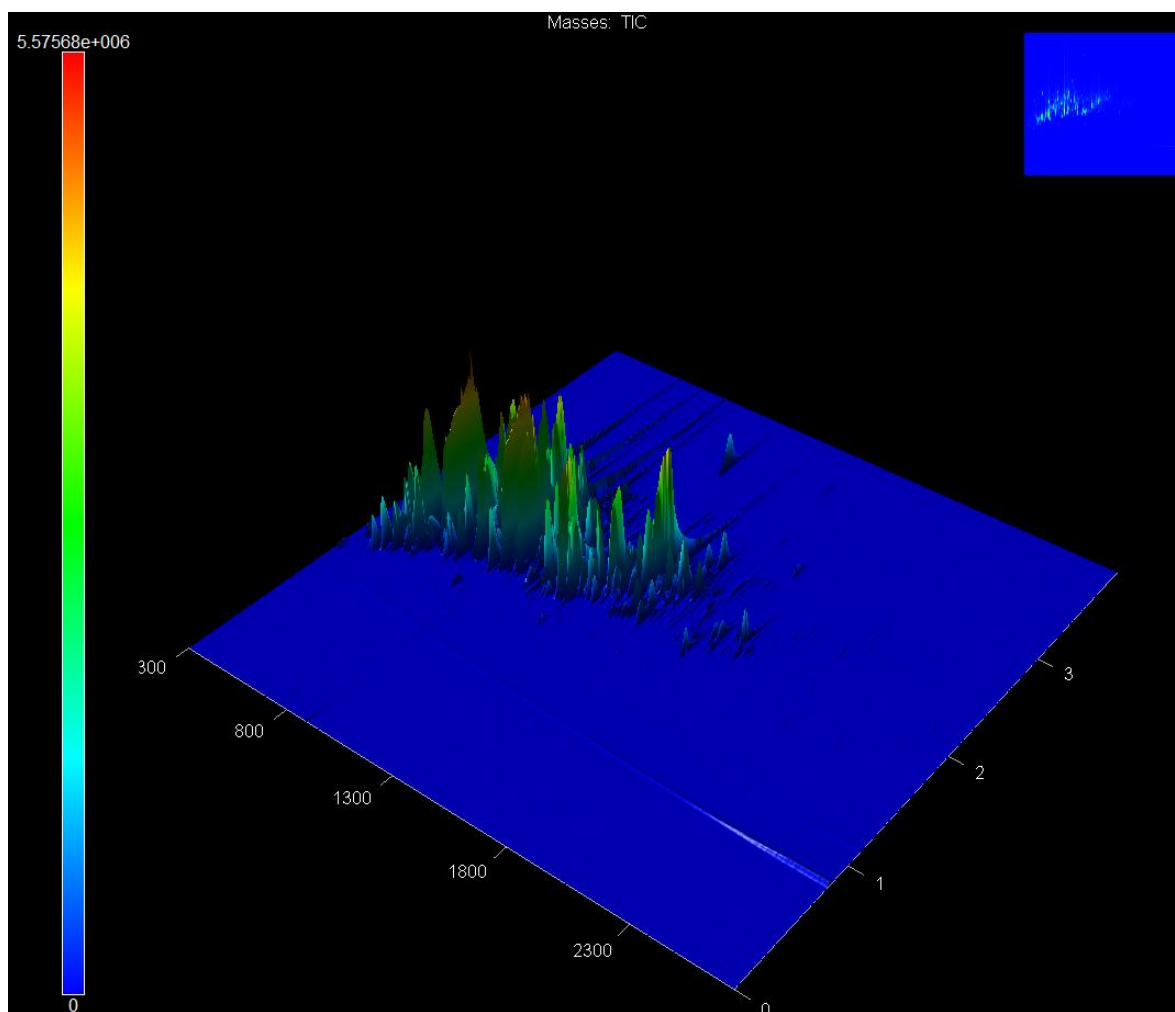
Terpeny	Plocha píku [mV.s]
Acyklické hemiterpeny	504492
Acyklické monoterpeny	868780106408
Monocyklické monoterpeny	2550726699308
Bicyklické monoterpeny	108574357
Acyklické seskviterpeny	38297840
Monocyklické seskviterpeny	14038975
Bicyklické seskviterpeny	62111964
Tricyklické seskviterpeny	64077081
Acyklické diterpeny	395130



Graf. č. 4.4.1: Grafické znázornění zastoupení terpenů v levandulovém extraktu získaném destilací vodní parou



Graf. č. 4.4.2: Grafické znázornění zastoupení terpenů v levandulovém extraktu získaném destilací vodní parou

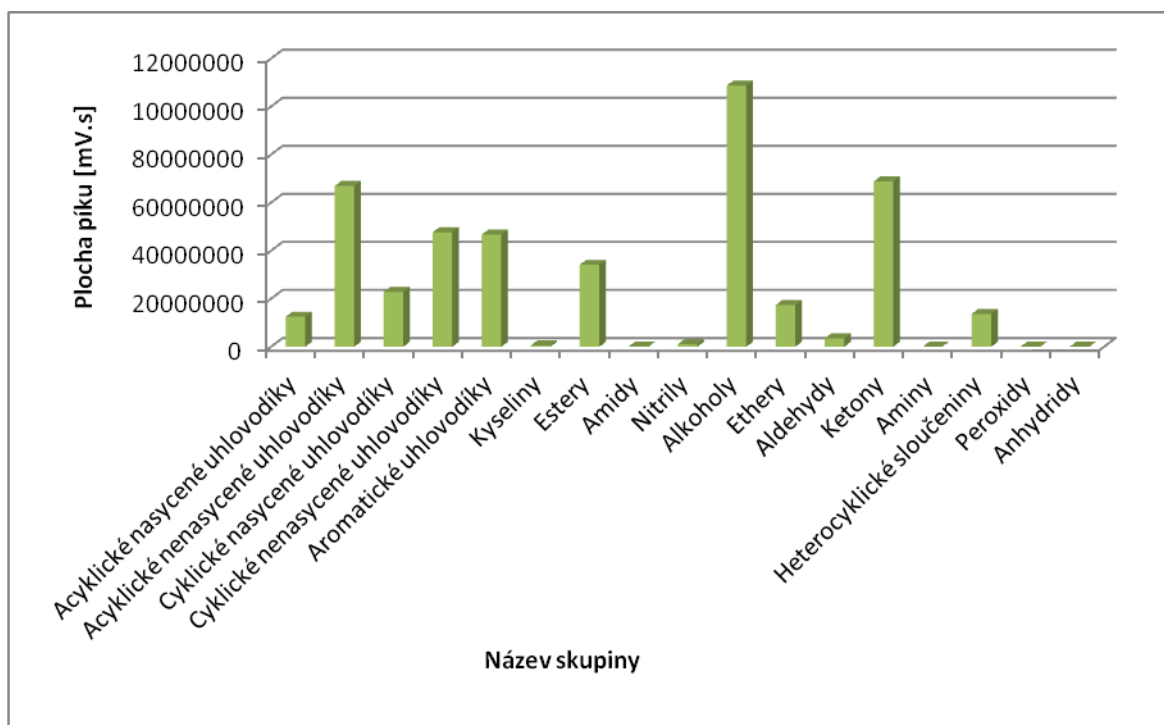


Obrázek č. 4.2: 3D chromatogram levandulového extraktu získaném destilací vodní parou



Tabulka č. 4.5: Zastoupení chemických skupin v mátovém extraktu získaném destilací vodní parou

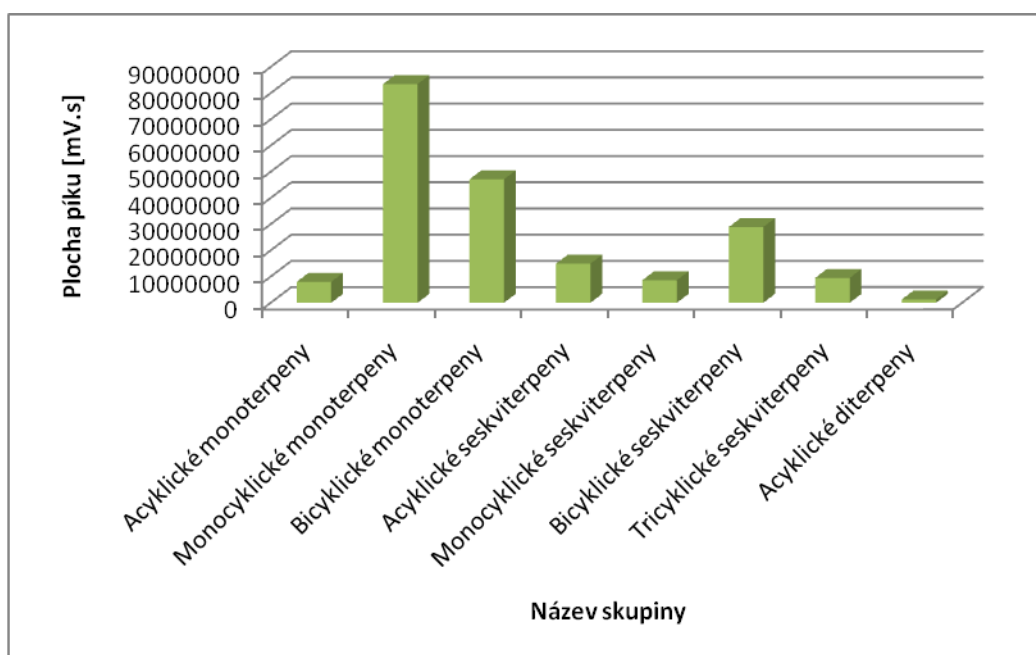
Název skupiny	Plocha píku [mV.s]
Acyklické nasycené uhlovodíky	12536579
Acyklické nenasycené uhlovodíky	66955535
Cyklické nasycené uhlovodíky	22817224
Cyklické nenasycené uhlovodíky	47696079
Aromatické uhlovodíky	46717854
Kyseliny	543445
Estery	34138240
Amidy	130651,8
Nitrily	1049294
Alkoholy	108716552
Ethery	17379370
Aldehydy	3475037
Ketony	68812662
Aminy	29233
Heterocyklické sloučeniny	13690887
Peroxidy	86212
Anhydridy	37649



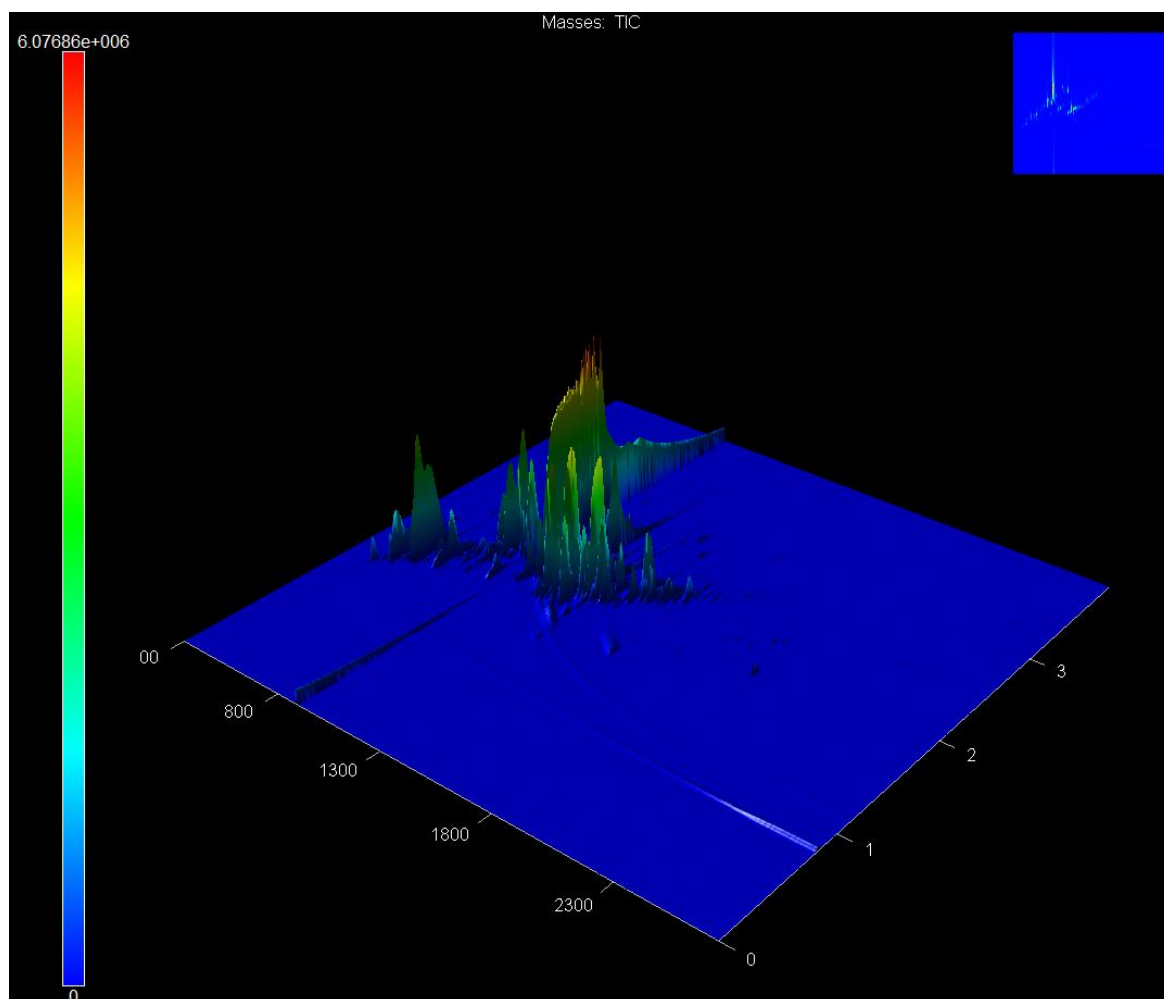
Graf č. 4.5: Grafické znázornění chemických skupin v mátovém extraktu získaném destilací vodní parou

Tabulka č. 4.6: Zastoupení terpenů v mátovém extraktu získaném destilací vodní parou

Terpeny	Plocha píku [mV.s]
Acyklické monoterpeny	7969826
Monocyklické monoterpeny	83446690
Bicyklické monoterpeny	47098729
Acyklické seskviterpeny	14883426
Monocyklické seskviterpeny	8604352
Bicyklické seskviterpeny	28888712
Tricyklické seskviterpeny	9480528
Acyklické diterpeny	1195663



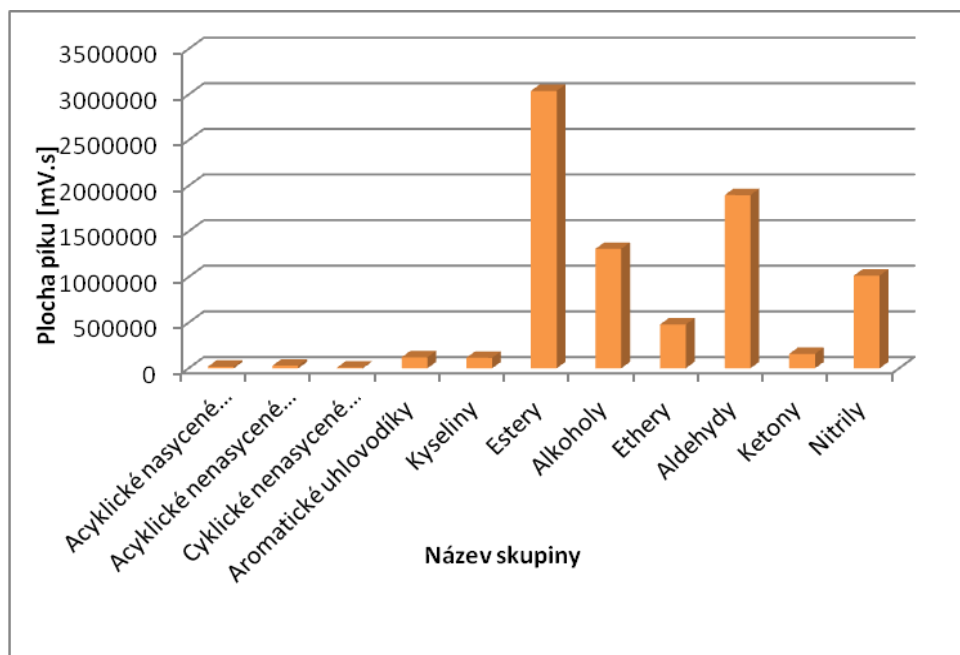
Graf. č. 4.6: Grafické znázornění zastoupení terpenů v mátovém extraktu získaném destilací vodní parou



Obrázek č. 4.3: 3D chromatogram mátového extraktu získaném destilací vodní parou

Tabulka č. 4.7: Zastoupení chemických skupin v meduňkovém extraktu získaném destilací vodní parou

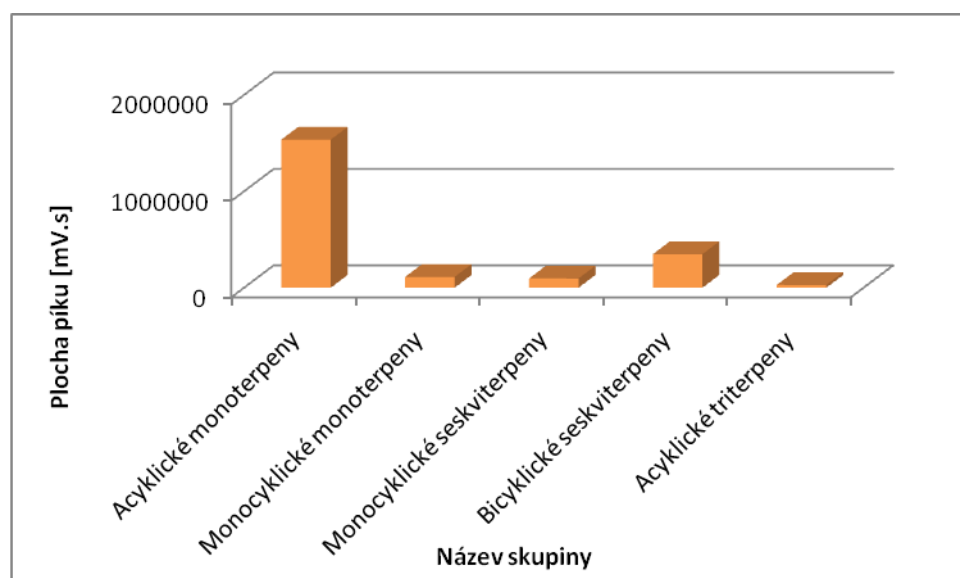
Název skupiny	Plocha píku [mV.s]
Acyklické nasycené uhlovodíky	18011
Acyklické nenasyčené uhlovodíky	28959
Cyklické nenasyčené uhlovodíky	8749,9
Aromatické uhlovodíky	121039
Kyseliny	114507
Estery	3040481
Alkoholy	1309215
Ethery	479728
Aldehydy	1898283
Ketony	157972
Nitrily	1016034



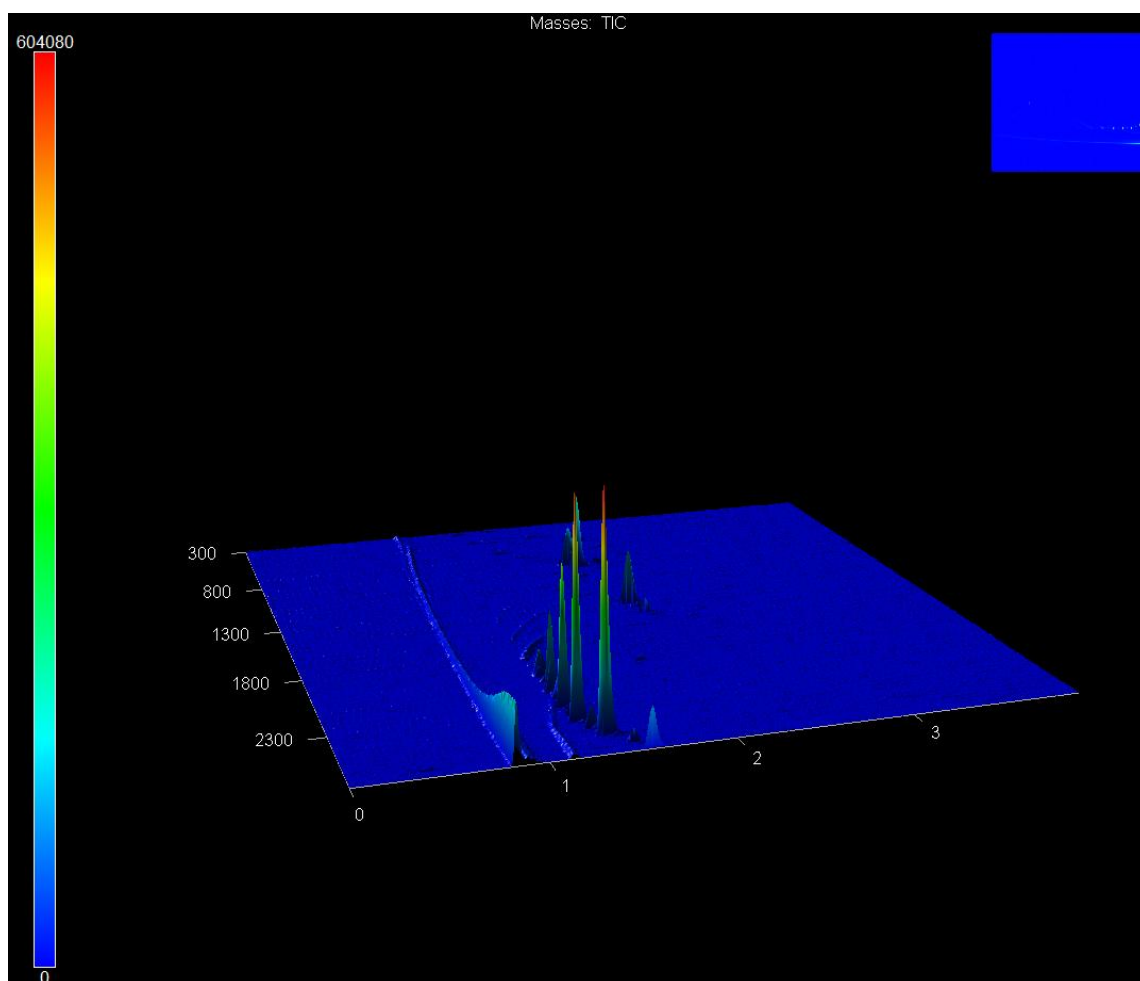
Graf č. 4.7: Grafické znázornění chemických skupin v meduňkovém extraktu získaném destilací vodní parou

Tabulka č. 4.8: Zastoupení terpenů v meduňkovém extraktu získaném destilací vodní parou

Terpeny	Plocha píku [mV.s]
Acyklické monoterpeny	1535826
Monocyklické monoterpeny	111917
Monocyklické seskviterpeny	95674
Bicyklické seskviterpeny	348198
Acyklické triterpeny	28959



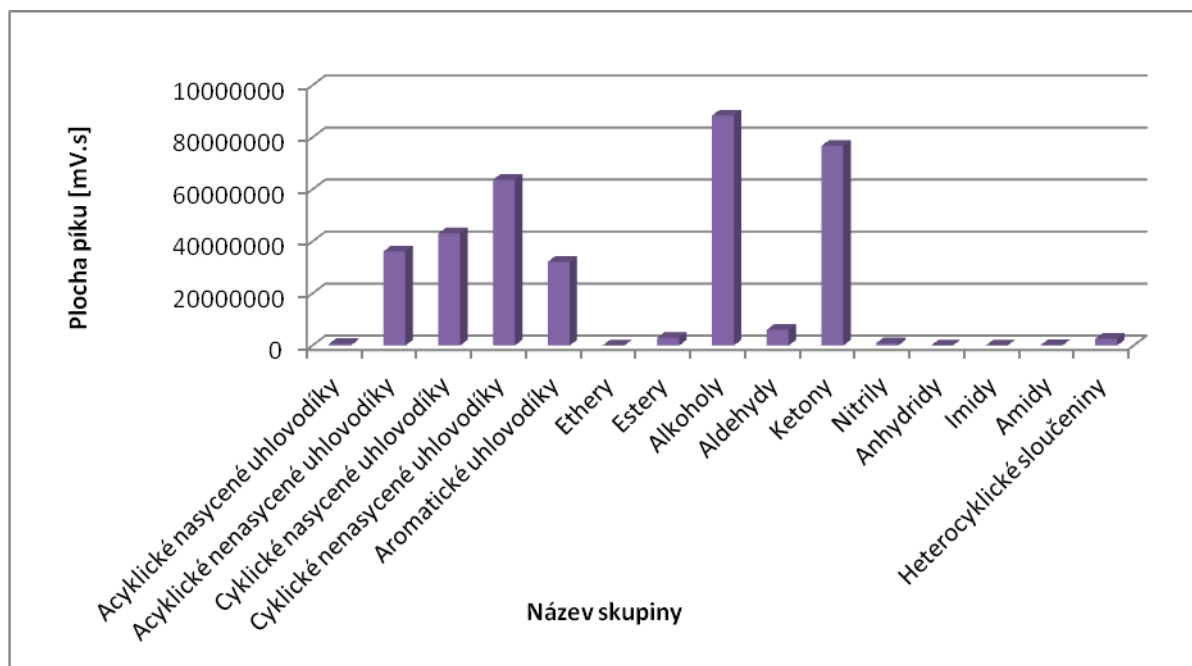
Graf. č. 4.8: Grafické znázornění zastoupení terpenů v meduňkovém extraktu získaném destilací vodní parou



Obrázek č. 4.4: 3D chromatogram meduňkového extraktu získaném destilací vodní parou

Tabulka č. 4.9: Zastoupení chemických skupin v šalvějovém extraktu získaném destilací vodní parou

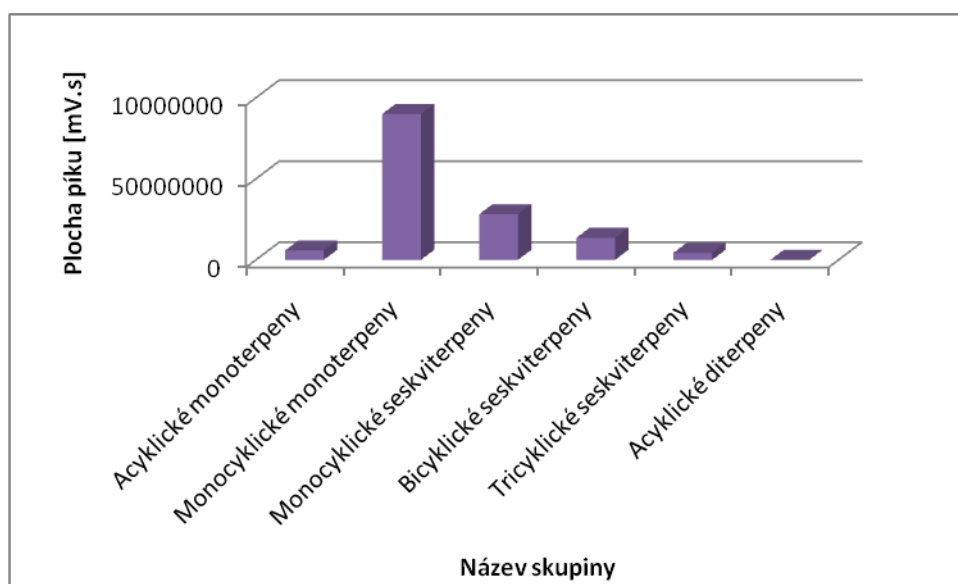
Název skupiny	Plocha píku [mV.s]
Acyklické nasycené uhlovodíky	617633
Acyklické nenasycené uhlovodíky	36201062
Cyklické nasycené uhlovodíky	43117225
Cyklické nenasycené uhlovodíky	63744382
Aromatické uhlovodíky	32199658
Ethery	12981
Estery	3040481
Alkoholy	88420444
Aldehydy	6060564
Ketony	76744621
Nitrily	939437
Anhydridy	43124
Imidy	16220
Amidy	139283
Heterocyklické sloučeniny	2632222



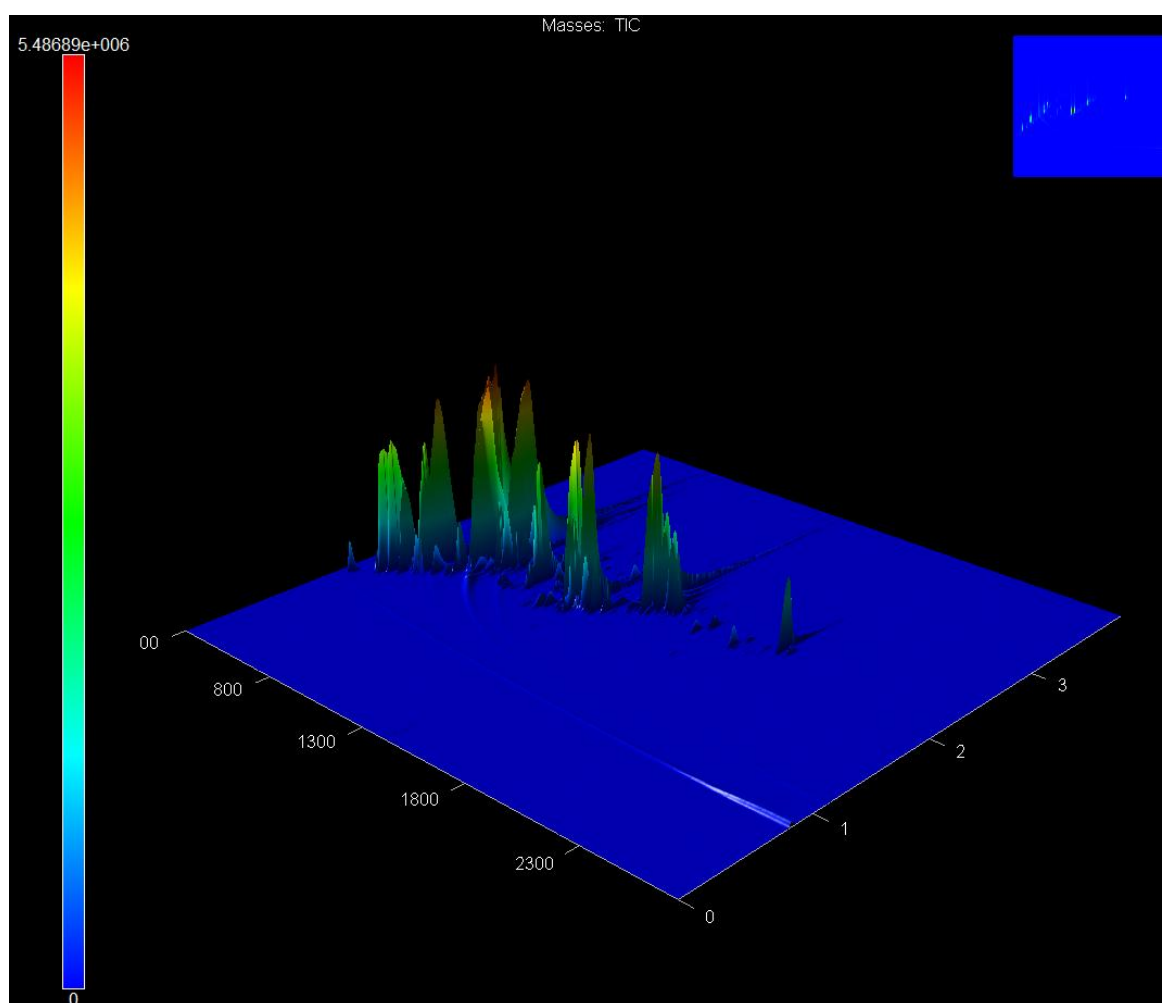
Graf č. 4.9: Grafické znázornění chemických skupin v šalvějovém extraktu získaném destilací vodní parou

Tabulka č. 4.10: Zastoupení terpenů v šalvějovém extraktu získaném destilací vodní parou

Terpeny	Plocha píku [mV.s]
Acyklické monoterpeny	5802896
Monocyklické monoterpeny	89991108
Monocyklické seskviterpeny	28176191
Bicyklické seskviterpeny	13583562
Tricyklické seskviterpeny	4346104
Acyklické diterpeny	36446



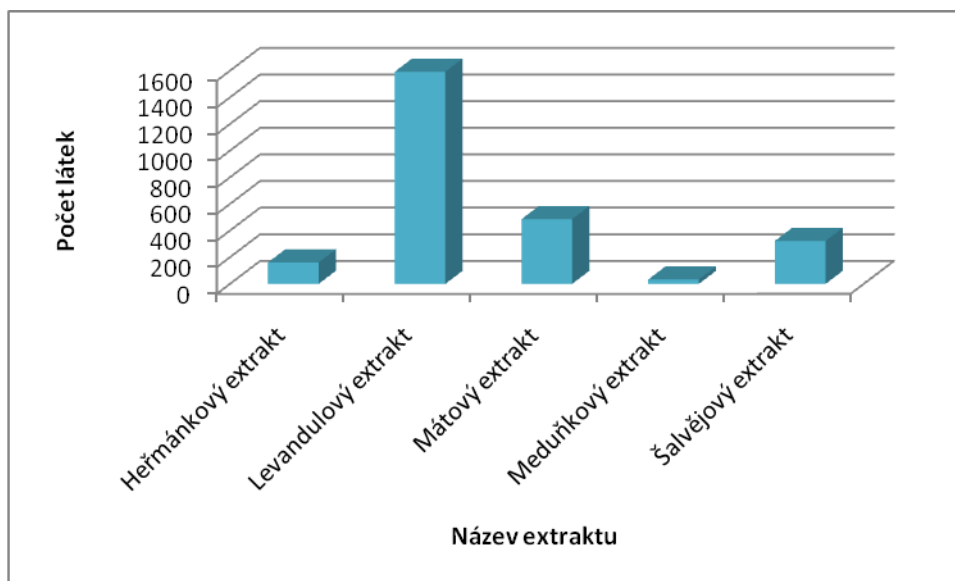
Graf. č. 4.10: Grafické znázornění zastoupení terpenů v šalvějovém extraktu získaném destilací vodní parou



Obrázek č. 4.5: 3D chromatogram šalvějového extraktu získaném destilací vodní parou

#### 4.1.1 Porovnání počtu identifikovaných chemických sloučenin ve vzorcích

V grafu č. 4.11 je uvedeno srovnání počtu identifikovaných sloučenin v jednotlivých extraktech. V heřmánkovém extraktu bylo identifikováno celkem 160 různých těkavých sloučenin, v levandulovém extraktu celkem 1593 různých těkavých sloučenin, v mátovém extraktu bylo identifikováno celkem 486 různých těkavých sloučenin, v meduňkovém celkem 33 různých těkavých sloučenin a v šalvějovém extraktu 323 různých těkavých látek.



Graf č. 4.11: Celkový počet identifikovaných sloučenin v jednotlivých extraktech

Z grafu vyplývá, že nejvíce vonných látek bylo nalezeno v levandulovém extraktu. Naproti tomu meduňkový extrakt je nejméně bohatý na vonné látky.

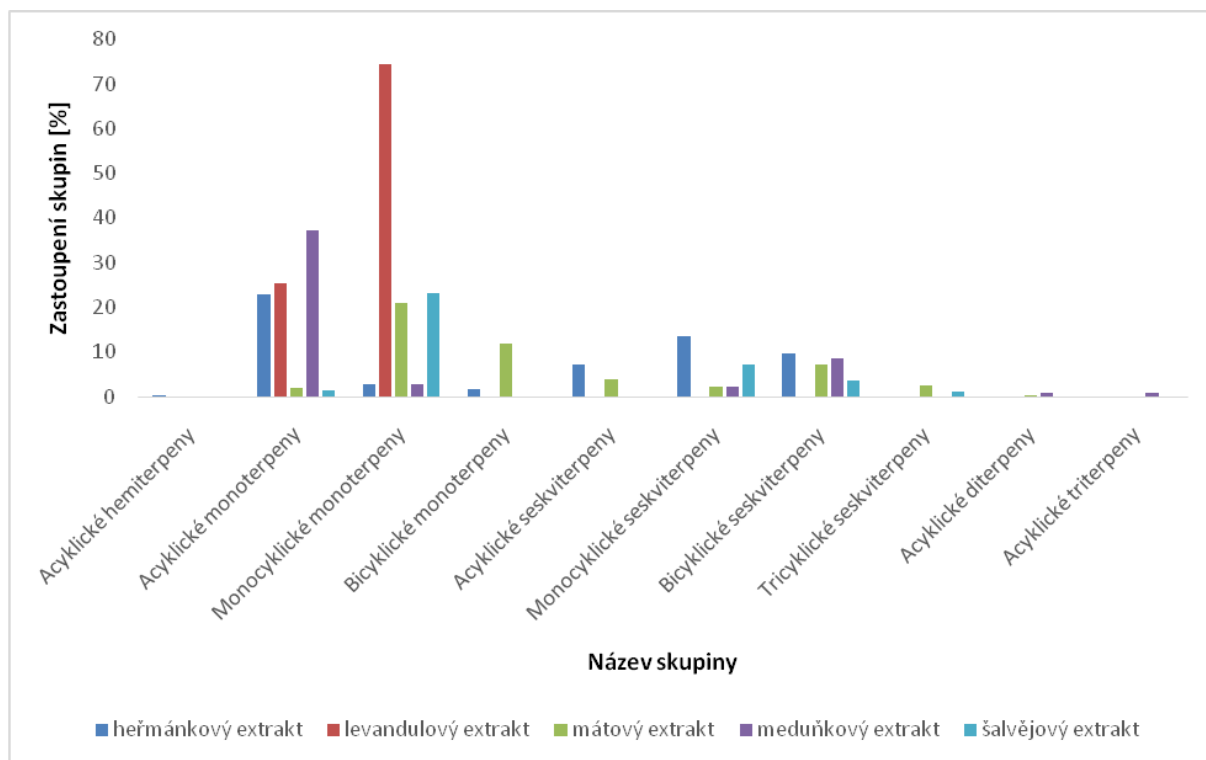
#### 4.1.2 Porovnání obsahu terpenů vonných látek v extraktech

Tabulka č. 4.11 uvádí procentuální zastoupení ploch jednotlivých terpenových látek obsažených ve studovaných extraktech, které byly získány destilací vodní parou. Z grafu č. 4.12 je patrné, že nejvíce procentuálně zastoupenou skupinou terpenů jsou monocyklické monoterpeny, které tvoří až 74,56 % plochy levandulového extraktu. Lze se tedy domnívat, že právě monocyklické monoterpeny nejvíce ovlivňují celkovou vůni levandulového extraktu. V mátovém extraktu se také ve větším množství vyskytují monocyklické monoterpeny, tvoří až 20,89 % z celkové plochy. Šalvějový extrakt obsahuje 23,12 % monocyklických terpenů. Ve větším množství jsou v extraktech přítomny i acyklické monoterpeny. V heřmánkovém extraktu je zastoupeno 22,79 % z celkové plochy, v levandulovém extraktu 25,40 %. V meduňkovém extraktu až 37,13 %. Acyklický hemiterpen, sulcaton, byl v levandulovém a heřmánkovém extraktu ve velmi malém množství. Acyklický triterpen byl identifikován pouze v meduňkovém extraktu v minimálním množství.



Tabulka č. 4.11: Procentuální zastoupení terpenových skupin identifikovaných sloučenin v extraktech získaných destilací vodní parou

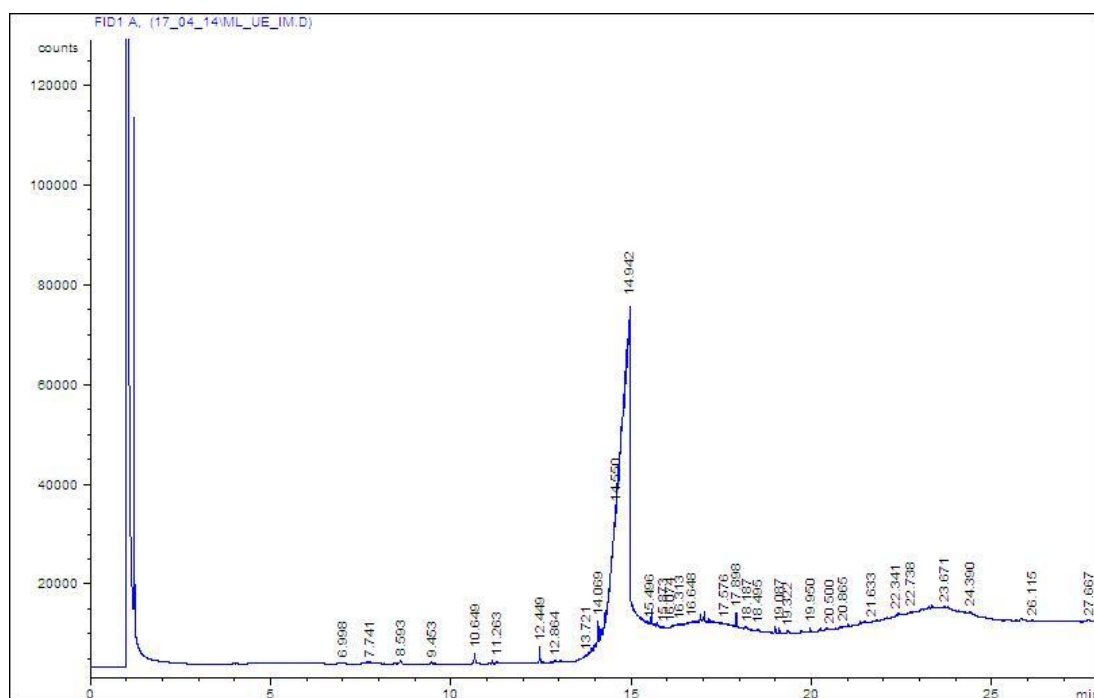
	<b>Zastoupení terpenových skupin v extraktech [%]</b>				
	<b>Heřmánkový extrakt</b>	<b>Levandulový extrakt</b>	<b>Mátový extrakt</b>	<b>Meduňkový extrakt</b>	<b>Šalvějový extrakt</b>
Acyklické hemiterpeny	0,15	0,000 015	ND	ND	ND
Acyklické monoterpeny	22,79	25,40	1,99	37,13	1,49
Monocyklické monoterpen	2,71	74,56	20,89	2,71	23,12
Bicyklické monoterpeny	1,66	0,003	11,79	ND	ND
Acyklické seskviterpeny	6,95	0,001	3,73	ND	ND
Monocyklické seskviterpeny	13,43	0,000 4	2,15	2,31	7,24
Bicyklické seskviterpeny	9,60	0,0018	7,23	8,42	3,49
Tricyklické seskviterpeny	0,00	0,0019	2,37	ND	1,12
Acyklické diterpeny	ND	0,000012	0,30	ND	0,009
Acyklické triterpeny	ND	ND	ND	0,7	ND



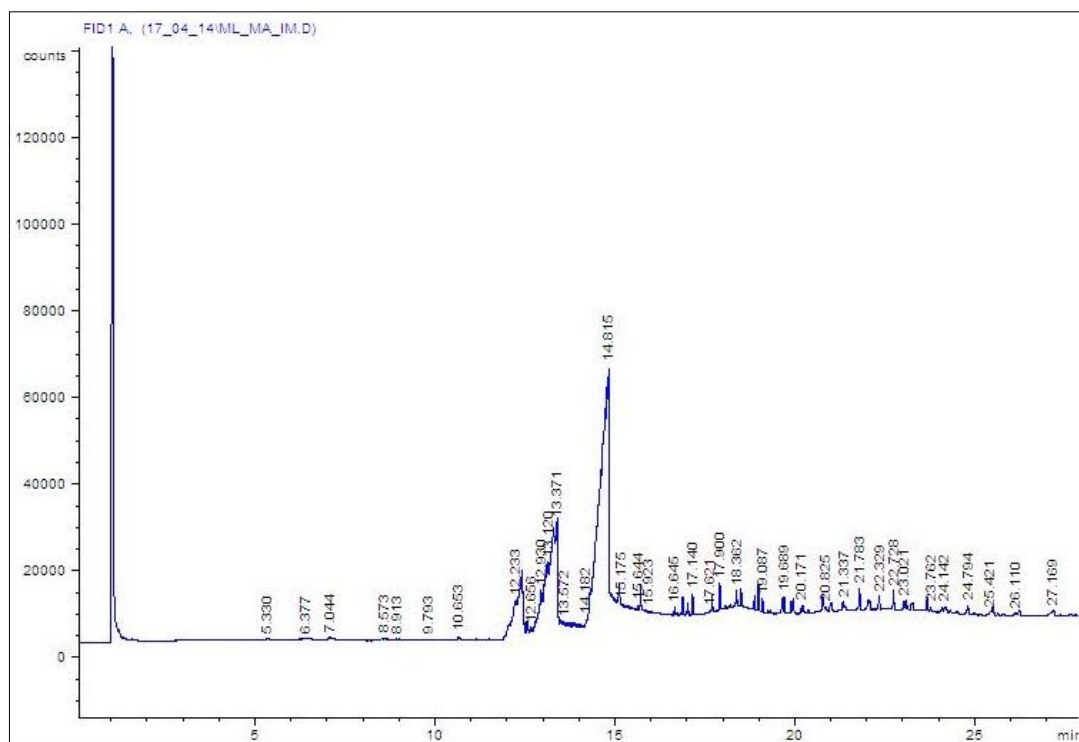
*Graf č. 4. 12: Procentuální zastoupení terpenových skupin identifikovaných sloučenin v extraktech získaných destilací vodní parou*

## 4.2 Porovnání chromatogramů extrakčních metod

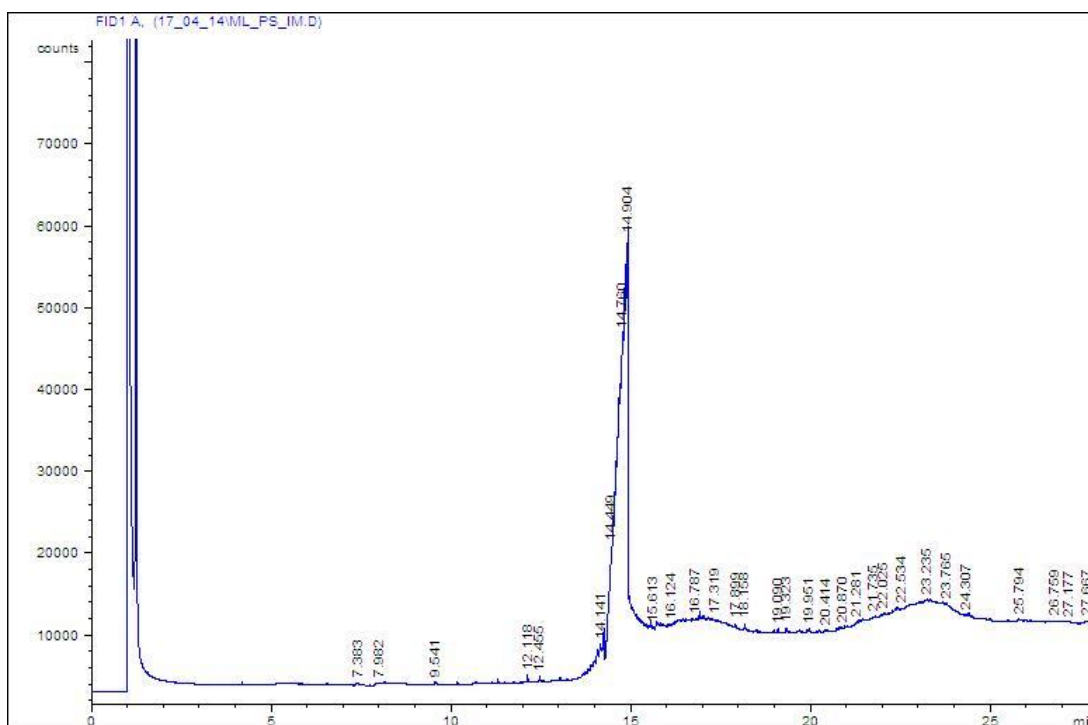
Extrakce byly prováděny také s použitím iontové kapaliny jako extrakčním činidlem. Při extrakci s iontovou kapalinou byly naměřeny chromatogramy uvedené v obrázcích 4.6 – 4.8, za použití analytické metody GC-FID. Výsledné extrakty byly zředěny v methanolu a následně podrobeny analýze.



Obrázek č. 4.6: Chromatogram meduňkového extraktu získaný ultrazvukovou extrakcí činidlem  $\text{BMIMBF}_4$

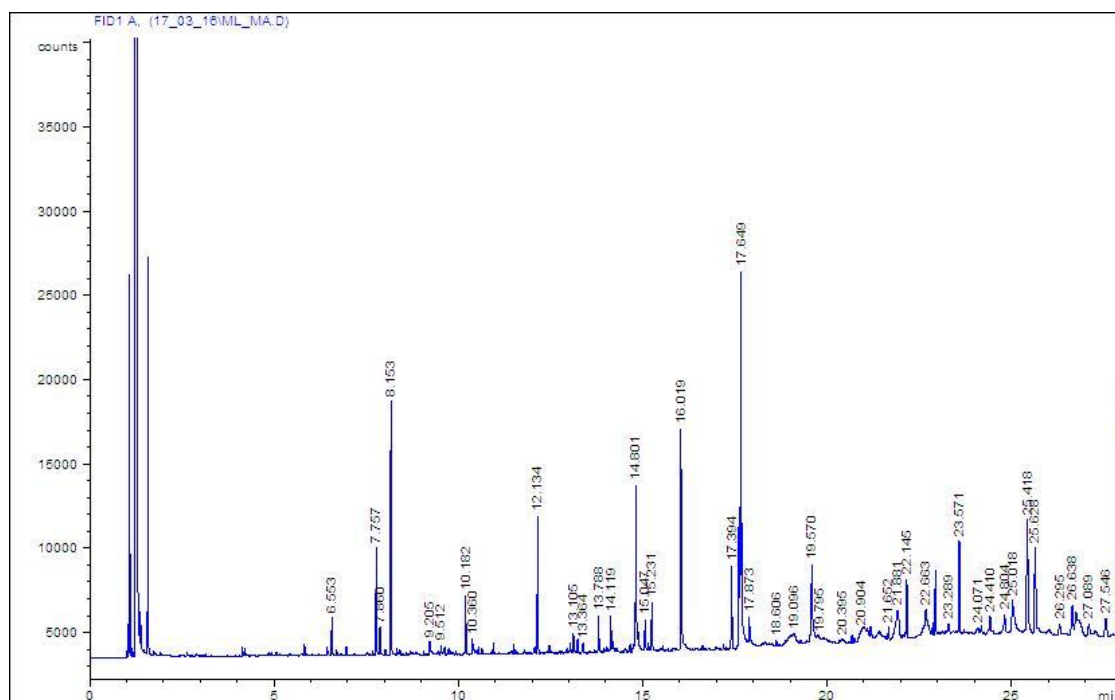


Obrázek č. 4.7: Chromatogram meduňkového extraktu získaný mikrovlnnou extrakcí činidlem  $\text{BMIMBF}_4$



Obrázek č. 4.8: Chromatogram meduňkového extraktu získaný tlakovou extrakcí rozpouštědlem s činidlem  $\text{BMIMBF}_4$

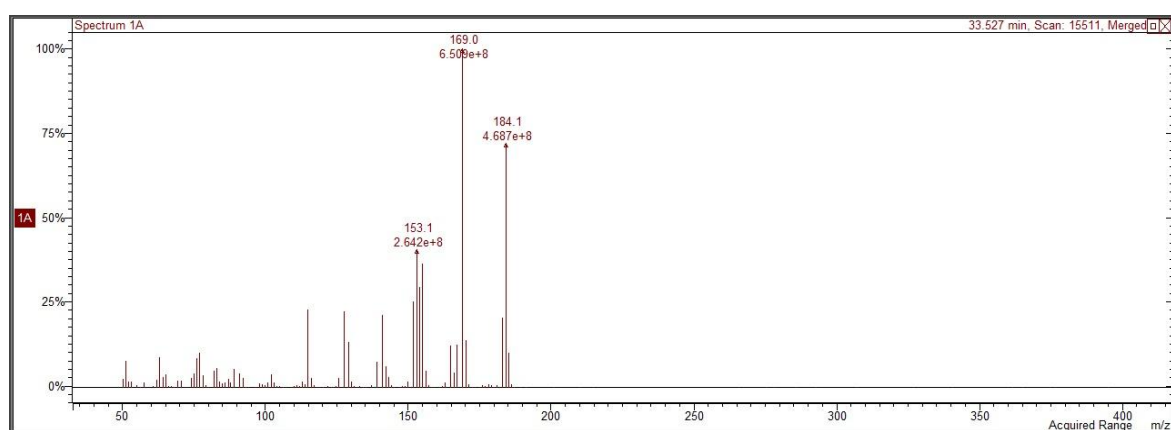
Na chromatografické koloně došlo k rozdělení analyzovaného vzorku, kde nejvíce píků, tedy počet složek, je viděn na chromatogramu meduňkového extraktu získaného mikrovlnnou extrakcí. Identifikace získaných složek nebyla provedena. Pro vizuální srovnání je uveden obrázek č. 4.9, na kterém je chromatogram meduňkového extraktu získaného mikrovlnnou extrakcí za použití extrakčního činidla ethylacetátu.



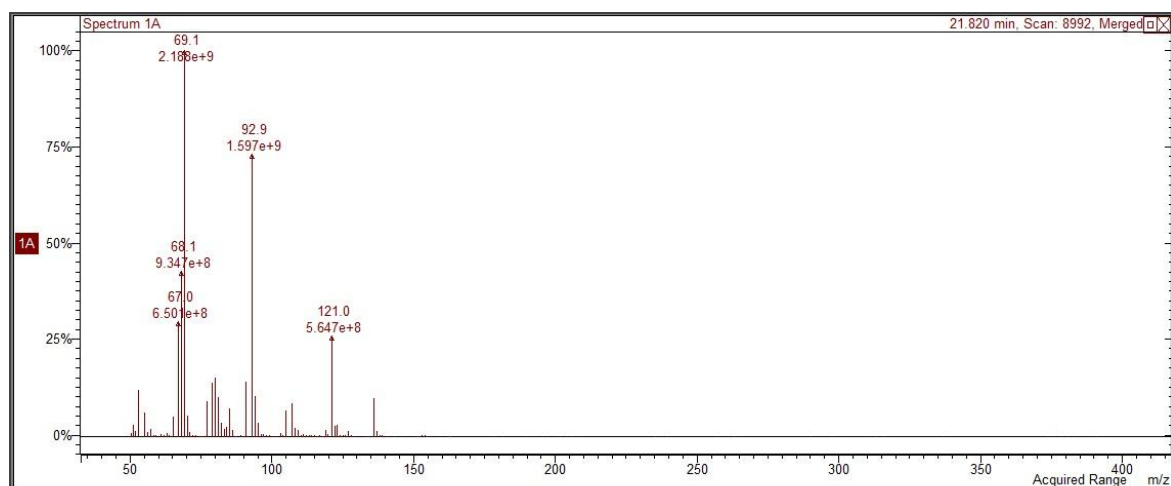
Obrázek č. 4.9: Chromatogram meduňkového extraktu získaný mikrovlnnou extrakcí s použitým činidlem EtAc

### 4.3 Hmotnostní spektra významných vonných látek ze získaných extraktů

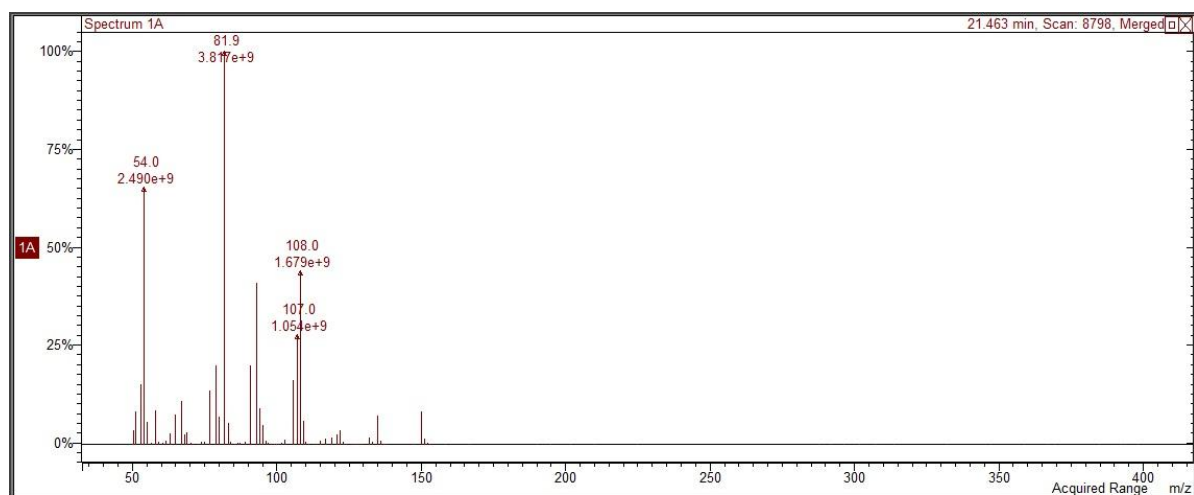
Extraktů získané destilací vodní parou byly podrobeny analýze metodou GC/MS. Touto metodou byla zjištěna hmotnostní spektra vonných látek. Ukázky hmotnostních spekter významných vonných látek jsou uvedeny v *obrázcích č. 4.10 – 4.14*. Ukázka chromatogramů extraktů je uvedena v *příloze 2*.



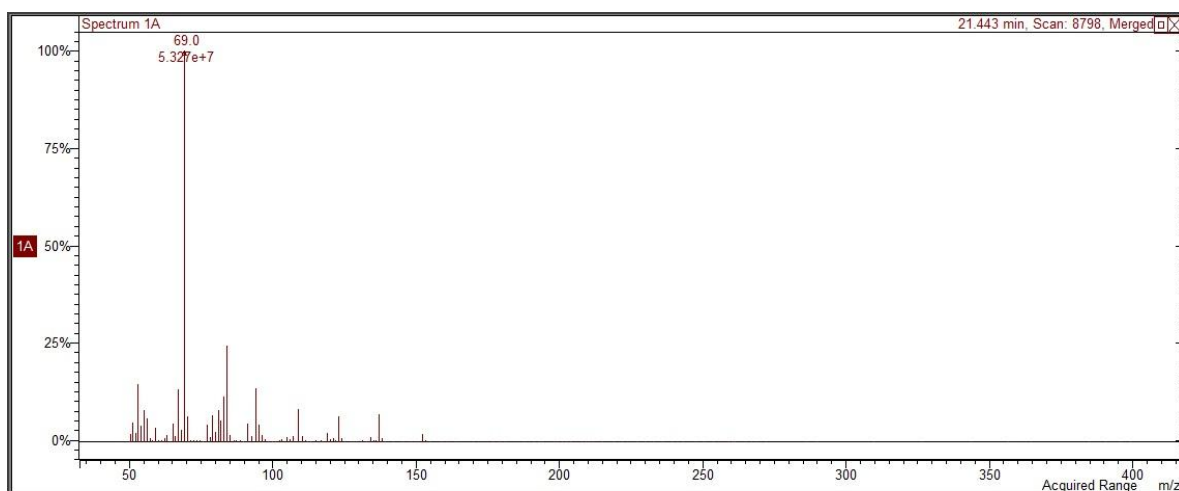
Obrázek č. 4.10: Hmotnostní spektrum chamazulenu identifikovaného v heřmánkovém extraktu



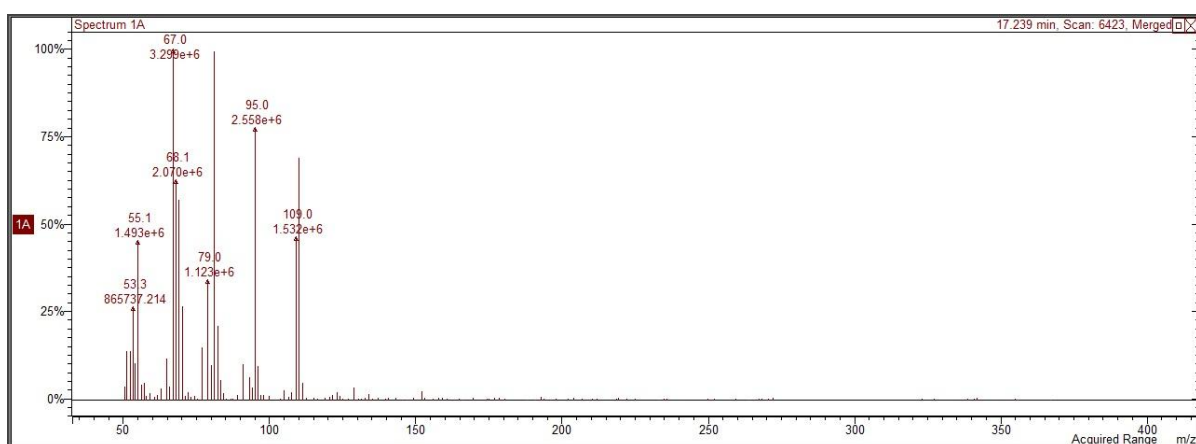
Obrázek č. 4.11: Hmotnostní spektrum lavandulylacetátu identifikovaného v levandulovém extraktu



Obrázek č. 4.12: Hmotnostní spektrum (-)-carvonu identifikovaného v mátovém extraktu



Obrázek č. 4.13: Hmotnostní spektrum  $\alpha$ -citralu identifikovaného v meduňkovém extraktu



Obrázek č. 4.14: Hmotnostní spektrum thujonu identifikovaného v šalvěřovém extraktu

#### 4.4 Povrchová analýza

Za účelem studování změny povrchové struktury a pochopení extrakčního mechanismu, během různých extrakčních technik, byly vzorky podrobeny povrchové analýze.

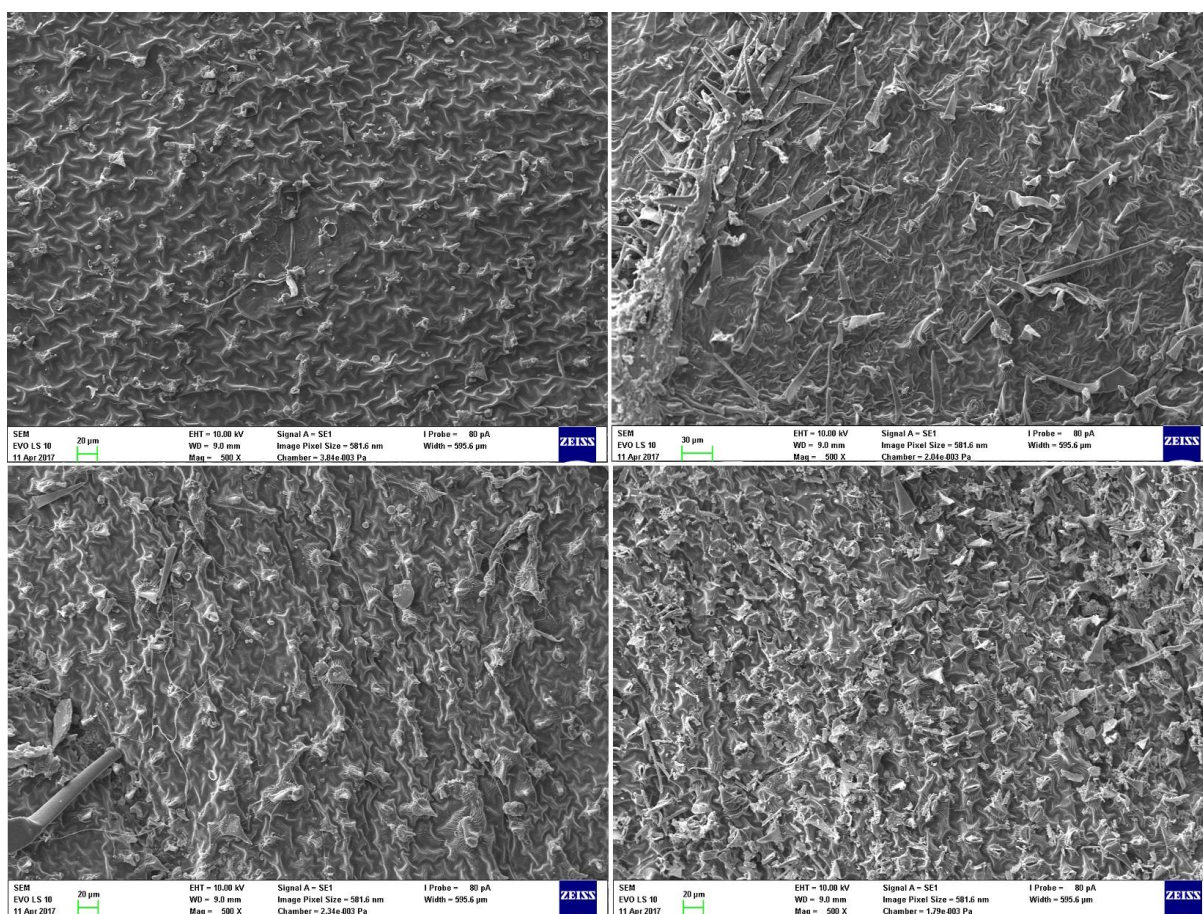
Jako reprezentativní vzorek pro rastrovací elektronovou mikroskopii byla zvolena meduňka lékařská. Vzorky byly odebrány před a po provedené extrakci, vysušeny, očištěny a byla provedena povrchová analýza. Navíc byl odebrán vzorek po mikrovlnné extrakci za použití iontové kapaliny jako rozpouštědla. Vzorek byl upraven stejným způsobem a podroben povrchové analýze.

Snímky byly pořízeny v rozlišení 10 – 30  $\mu\text{m}$ , při zvětšení 500 $\times$ , 1000 $\times$ , 1500 $\times$ . Uvedené obrázky č. 4.15 – 4.17 porovnávají povrchové struktury vzorku před a po provedené extrakci s vysušeným listem meduňky.

Na povrchu vysušeného listu meduňky je patrná žilnatina, krycí trichomy jednobuněčné a mnohobuněčné, žláзка (Lamiaceae). Nejsou zde vidět průduchy. Na snímku pořízeném po ultrazvukové extrakci lze vidět otevřené průduchy (diacytické), protažené krycí trichomy,

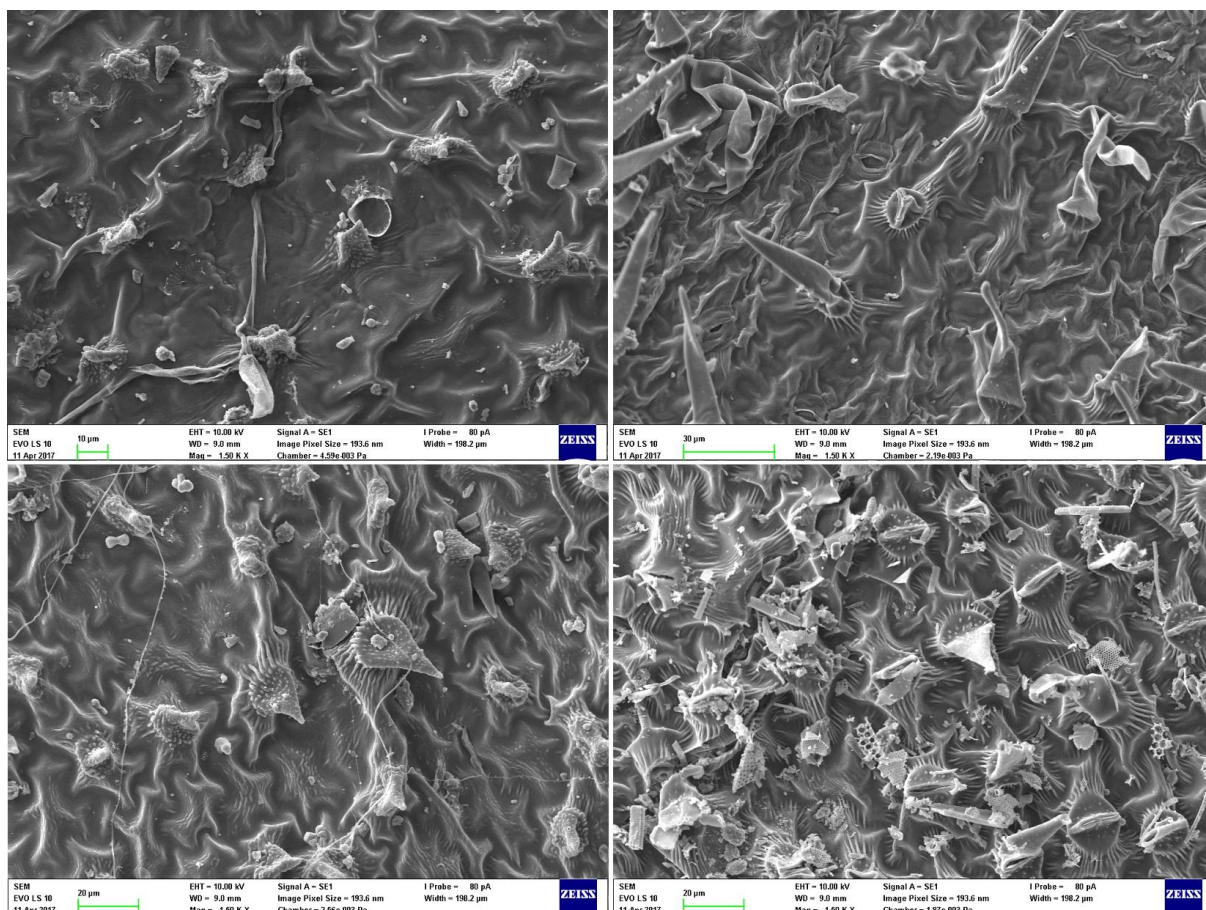


vrásčitější povrch listu. Struktura povrchu listu je nejméně narušena v porovnání s ostatními extrakčními technikami. Naproti tomu povrch listu je nejvíce narušen po tlakové extrakci rozpouštědlem. Zvýšení tlaku způsobilo roztržení krycích trichomů a došlo k značné destrukci povrchu listu. Na snímku jsou patrné poškozené pokožkové buňky. Po mikrovlnné extrakci je pozorována na snímcích více vystouplá žilnatina. Povrch pokožky listu nebyl téměř narušen, ve srovnání se snímkem po tlakové extrakci rozpouštědlem. Při mikrovlnné extrakci za použití iontové kapaliny (BMIMBF<sub>4</sub>) jako extrakčního činidla došlo k značné destrukci povrchu listu. Pořízený snímek je hodně podobný snímku pořízenému po tlakové extrakci za použití organického extrakčního činidla (EtAc). Došlo k roztržení některých krycích trichomů a poškození pokožkových buněk.

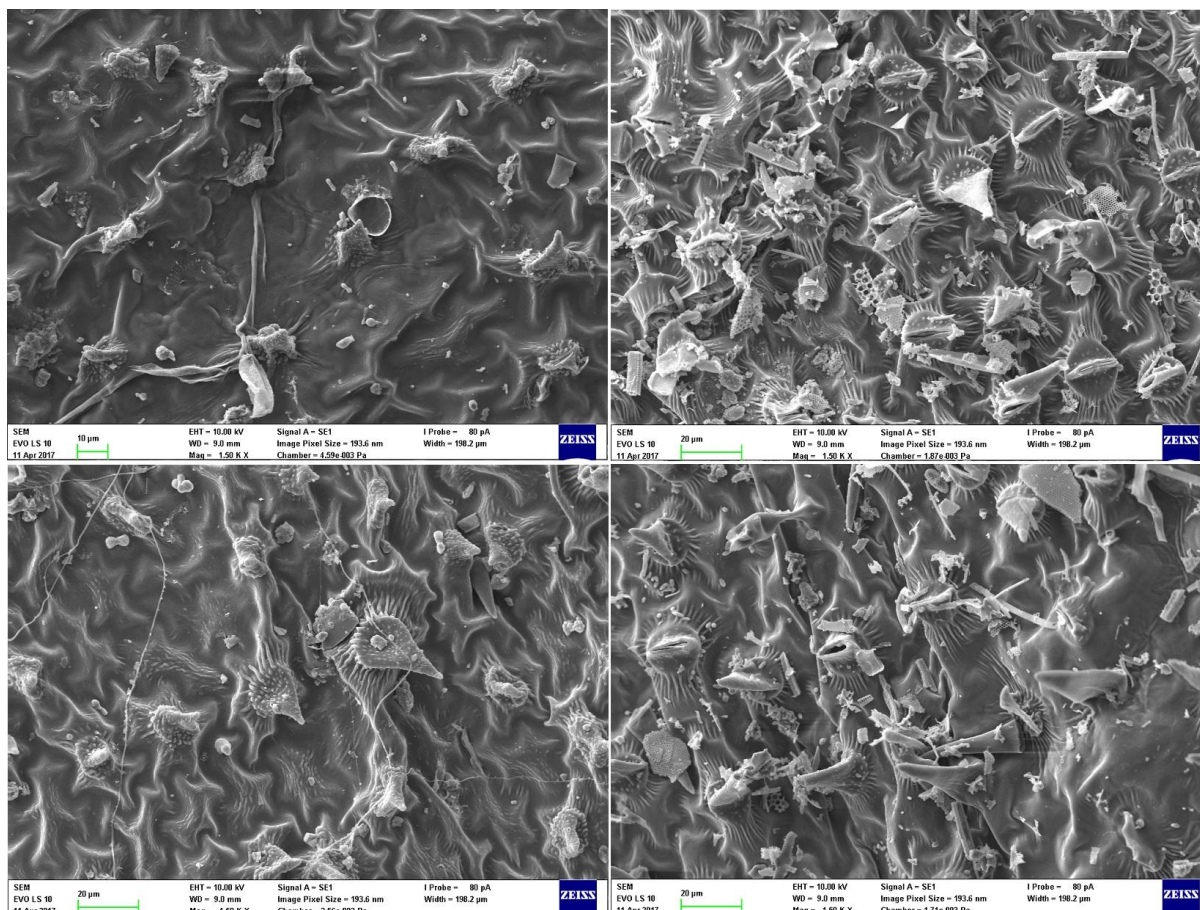


Obrázek č. 4.15: Povrch listu meduňky lékařské v plošnějším zobrazení 500×. Vlevo nahoře – vysušený list v měřítku 20 μm. Vpravo nahoře – list po ultrazvukové extrakci v měřítku 30 μm. Vlevo dole – list po mikrovlnné extrakci v měřítku 20 μm. Vpravo dole – list po extrakci podporované tlakem 20 μm





Obrázek č. 4.16: Povrch listu meduňky lékařské, zobrazení 1500 $\times$ . Vlevo nahoře – vysušený list v měřítku 10  $\mu$ m. Vpravo nahoře – list po ultrazvukové extrakci v měřítku 30  $\mu$ m. Vlevo dole – list po mikrovlnné extrakci v měřítku 20  $\mu$ m. Vpravo dole – list po extrakci podporované tlakem v měřítku 20  $\mu$ m



Obrázek č. 4.17: Povrch listu meduňky lékařské, zobrazení 1500 $\times$ . Vlevo nahoře – vysušený list v měřítku 10  $\mu$ m. Vpravo nahoře – list po extrakci podporované tlakem v měřítku 20  $\mu$ m. Vlevo dole – list po mikrovlnné extrakci v měřítku 20  $\mu$ m. Vpravo dole – list po mikrovlnné extrakci za použití IL v měřítku 20  $\mu$ m

## 5 ZÁVĚR

Hlavním cílem této diplomové práce bylo pomocí separačních technik ve spojení s hmotnostní spektrometrií charakterizovat složení získaných extraktů. Izolace vonných látek z vybraných přírodních materiálů byla provedena pomocí destilace vodní parou, ultrazvukové extrakce, mikrovlnné extrakce a tlakové extrakce rozpouštědlem. Na základě výsledků literární rešerše a s přihlédnutím k dostupnosti chemikálií byla zvolena extrakční činidla s ohledem na životní prostředí. Z preferovaných organických rozpouštědel byl zvolen ethylacetát a z tzv. zelených rozpouštědel byla vybrána iontová kapalina 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborát.

Získané extrakty byly nejdříve analyzovány pomocí metody GC-FID, za účelem zjištění přítomnosti vonných látek. Pomocí metody GC/MS byla získána hmotnostní spektra významných vonných látek obsažených v extraktech. Stěžejní analytickou metodou byla GCxGC/TOF-MS. Touto metodou byly analyzovány extrakty získané destilací vodní parou. V heřmánkovém extraktu bylo celkem identifikováno 160 vonných látek, v levandulovém extraktu celkem 1593 vonných látek, v mátovém extraktu celkem 486 vonných látek, v meduňkovém extraktu celkem 33 vonných látek a v šalvějovém extraktu celkem 323 vonných látek. Extrakty získané ultrazvukovou extrakcí, mikrovlnnou extrakcí a tlakovou extrakcí rozpouštědlem byly rovněž podrobeny analýze. Tuhle metodou nebyly ve vzorcích identifikovány žádné vonné látky.

Semikvantitativní analýzou bylo zjištěno zastoupení chemických skupin v extraktech získaných destilací vodní parou. V heřmánkovém extraktu byly nejvíce zastoupenou chemickou skupinou acyklické nenasycené uhlovodíky, následně aromatické uhlovodíky, estery a alkoholy. V levandulovém extraktu převládala chemická skupina alkoholy, následovaly acyklické nenasycené uhlovodíky, estery a ketony. Alkoholy byly rovněž nejvíce zastoupenou chemickou skupinou v mátovém extraktu. Dále v mátovém extraktu byly identifikovány ketony, acyklické nenasycené uhlovodíky. V meduňkovém extraktu bylo identifikováno nejvíce esterů, aldehydů, alkoholů a následně nitrilů. Největší zastoupení v šalvějovém extraktu tvoří chemické skupiny alkoholy, ketony a cyklické nenasycené uhlovodíky. Nejvíce zastoupenou chemickou skupinou téměř u všech extraktů získaných destilací vodní parou jsou alkoholy.

Z chemických skupin byly vybrány terpeny. Levandulový extrakt byl velice bohatý na terpenové sloučeniny. Zastoupeny byly acyklické diterpeny (fytol, trans-geranylgeraniol) a také hemiterpeny (sulcaton). Z tricyklických seskviterpenů ve velkém množství byly identifikovány longifolen a patchoulen. V mátovém extraktu byly zjištěny z bicyklických seskviterpenů cedren a ylangen. Byl zde také identifikován fytol, který patří k acyklickým diterpenům. V heřmánkovém extraktu bylo největší zastoupení acyklických monoterpenů (lavandulyacetát, ocimen). Meduňkový extrakt byl nejméně bohatý na množství vonných látek. Největší zastoupení mají acyklické monoterpeny (alkohol linalool, cis-citral). Byla také izolována přírodní organická sloučenina aqualen. Jedná se o nenasycený uhlovodík a acyklický triterpen. Látka nebyla identifikována v ostatních extraktech. V šalvějovém extraktu byl rovněž nalezen acyklický diterpen fytol. Nejvíce zastoupenou skupinou terpenů téměř u všech extraktů byly acyklické a monocyklické monoterpeny.

Změny povrchové struktury listu před a po provedené extrakci byly pozorovány pomocí

rastrovací elektronové mikroskopie. Jako vhodný vzorek byla vybrána meduňka lékařská. Ze snímků je patrné, že ultrazvuková extrakce je šetrnější metodou v porovnání s tlakovou extrakcí rozpouštědlem, která naopak se zdá být metodou nejdestruktivnější.

Uvedená práce byla úspěšná v izolaci vonných látek destilací vodní parou a také při identifikaci jednotlivých chemických sloučenin. V levandulovém extraktu bylo izolováno 1593 chemických sloučenin. V roce 2012 bylo v levandulovém oleji stanoveno 300 chemických sloučenin [13]. V nejnovějších studiích bylo hydrodestilací levandule lékařské izolováno a následně identifikováno pomocí GC/MS s kvadrupólovým analyzátozem 42 chemických sloučenin [54]. Hydrodestilací máty kadeřavé bylo identifikováno pomocí GC/MS 34 chemických sloučenin [55]. Kapilární plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie je vhodnou metodou pro identifikaci chemických sloučenin. Systém Pegasus používá netradiční typ hmotnostního spektrometru, hmotnostní spektrometr s analyzátozem doby letu. Použití tohoto hmotnostního spektrometru pro GC-MS analýzu nabízí značné výhody pro analytika. Mezi tyto výhody patří zlepšení kvality analytických výsledků, což je dáno tím, že daný MS systém sbírá informace o vzorku velmi rychle, podstatně rychleji než jiné typy hmotnostních spektrometrů.



## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SLAVÍKOVÁ, Zdeňka. *Morfologie rostlin: určeno pro posl. fak. přírodovědecké*. 2. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1990. ISBN 80-706-6358-8.
- [2] HUBER, Franz X. J. a Anja SCHMIDT. *Praktická kniha vonných dýmů: [vonné tyčinky a vykuřovadla v praxi ; lexikon vonných látek]*. Olomouc: Fontána, 2005. ISBN 80-733-6102-7.
- [3] BOHÁČ, Ivan a Mária LENOCHOVÁ. *Cvičení z biologie pro 1. ročník gymnázií: pokusný text*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1979. Učební texty pro střední školy. Dostupné také z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:4270a5e0-eaf6-11e3-b72e-005056827e52>.
- [4] BAUŠE, Bohumil. *Herbář*. 5. vyd. Praha: Alois Hynek, 1919.
- [5] MAYER, Johannes Gottfried, Bernhard UEHLEKE a Kilian SAUM. *Bylinky z klášterní lékárny: více než 100 léčivých rostlin: přesné receptury pro úspěšné domácí použití*. Vydání třetí (zkrácené). Praha: Knížní klub, 2015. ISBN 978-80-242-4819-6.
- [6] JANČA, Jiří a Josef Antonín ZENTRICH. *Herbář léčivých rostlin*. Praha: Eminent, 1996. ISBN 80-858-7620-5.
- [7] LHOTSKÝ, Stanislav. *Cytologie a anatomie rostlin*. 2., upr. vyd. Dotisk. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1962.
- [8] Aromaterapie Dowling Mike Citace v seznamu literatury: DOWLING, Mike. *Aromaterapie*. 3. vyd. Čestlice: Rebo, 2009. ISBN 978-802-5502-716.
- [9] KINCL, Miloslav a Václav KRPEŠ. *Základy fyziologie rostlin*. 2. dopl. vyd. Ostrava: Montanex, 2000. ISBN 80-722-5041-8.
- [10] KRS, Václav a Radek HANEK. *Materiály I pro studijní obor Kosmetička*. 2., aktualiz. vyd. Praha: Informatorium, 2011. ISBN 978-80-7333-085-9.
- [11] VONÁŠEK, František, Ladislav NOVOTNÝ a Emilie TREPKOVÁ. *Látky vonné a chuťové*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1964. ISBN 04-843-64.
- [12] BAHARUM, Syarul Nataqain, Hamidun BUNAWAN, Ma'aruf Abd. GHANI, Wan Aida Wan MUSTAPHA a Normah Mohd NOOR. Analysis of the Chemical Composition of the Essential Oil of Polygonum minus Huds. Using Two-Dimensional Gas Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry (GC-TOF MS). *Molecules* [online]. 2010, **15**(10), 7006-7015 [cit. 2016-09-24]. DOI: 10.3390/molecules15107006. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/15/10/7006/>.
- [13] OHLOFF, Günther., Wilhelm PICKENHAGEN a Philip KRAFT. *Scent and chemistry: the molecular world of odors*. [New and rev. ed.]. Weinheim: Wiley-VCH, c2012. ISBN 39-063-9066-7.
- [14] TREPKOVÁ, Emilie a František VONÁŠEK. *Vůně a parfémy: tajemství přitažlivosti*. Praha: Maxdorf, 1997. ISBN 80-858-0048-9.
- [15] BAGHERI, Hossein, Mohd Yazid Bin ABDUL MANAP a Zeinab SOLATI. Antioxidant activity of Piper nigrum L. essential oil extracted by supercritical CO<sub>2</sub> extraction and hydro-distillation. *Talanta* [online]. 2014, **121**, 220-228 [cit. 2016-09-24]. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.01.007. ISSN 00399140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914014000095>.

- [16] McCOY, Anya. *Basic perfumery course*. Vyd. 5. Florida: Miami Shores, 2012.
- [17] MALLE, Bettina a Helge SCHMICKL. *Ätherische Öle selbst herstellen*. Neuaufl. Göttingen: Verl. Die Werkstatt, 2007. ISBN 978-389-5335-525.
- [18] Natural Essential Oils: Extraction Processes and Application to Some Major Oils. *Perfumer & Flavorist* [online]. 1984, 10 [cit. 2016-09-24]. Dostupné z: [http://www.perfumerflavorist.com/fragrance/application/multiuse/Natural-Essential-Oils--374506471.html?ajs\\_aid=dd0bbc49-c8dd-46a9-8650-4b1a2a257e50&ajs\\_uid=4791D3308367E5Y](http://www.perfumerflavorist.com/fragrance/application/multiuse/Natural-Essential-Oils--374506471.html?ajs_aid=dd0bbc49-c8dd-46a9-8650-4b1a2a257e50&ajs_uid=4791D3308367E5Y).
- [19] *Ultrasonic Extraction of Caffeine and Other Active Compound* [online]. Germany: Hielscher Ultrasonics GmbH, 2016 [cit. 2016-09-22]. Dostupné z: <https://www.hielscher.com/ultrasonic-extraction-of-caffeine-and-other-active-compounds.htm>.
- [20] ČÁSLAVSKÝ, Josef a Jiří Georg Kamil ŠEVČÍK. Analýza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy" : modul K02-2014. 1. vyd. Český Těšín: 2 THETA, 2014. Analytical standards and equipment. ISBN 978-80-260-7085-6.
- [21] VALÍČEK, Pavel. *Technické a siličnaté rostliny*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2006. ISBN 80-715-7936-X.
- [22] LI, Shuangyang, Fengli CHEN, Jun JIA, Zaizhi LIU, Huiyan GU, Lei YANG, Fei WANG a Fengjian YANG. Ionic liquid-mediated microwave-assisted simultaneous extraction and distillation of gallic acid, ellagic acid and essential oil from the leaves of *Eucalyptus camaldulensis*. *Separation and Purification Technology* [online]. 2016, **168**, 8-18 [cit. 2016-10-26]. DOI: 10.1016/j.seppur.2016.05.013. ISSN 13835866. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383586616303409>.
- [23] FARRER-HALLS, Gill. *Aromaterapie od A do Z: podrobný průvodce světem esenciálních olejů*. V Praze: Metafora, 2007. ISBN 978-80-7359-086-4.
- [24] GJUBBENET, Jelizaveta Rudol'fovna. *Rostliny a chlorofyl*. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1953. Studie a prameny. Dostupné také z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:9b5affc0-8a5d-11e2-a920-005056827e51>.
- [25] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [26] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990, 384 s. ISBN 80-030-0569-8.
- [27] Bielská L.: *Metody analytické extrakce perzistentních organických polutantů z pevných matric*. Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Brno 2006.
- [28] HUIE, Carmen W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2002, **373**(1-2), 23-30. DOI: 10.1007/s00216-002-1265-3. ISSN 1618-2642. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-002-1265-3>.
- [29] EARLE, Martyn J. a Kenneth R. SEDDON. Ionic Liquids: Green Solvents for the Future. *Pure and Applied Chemistry* [online]. 2000, vol. 72, isme 7. DOI: 10.1021/bk-2002-0819.ch002. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-2002-0819.ch002>.

- [30] FRIEDECKÝ, D.; LEMR, K. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Biochem. Metab*, 2012, 20.41: 152-157.
- [31] DELONG, Armin a Vladimír DRAHOŠ. *Praktická elektronová mikroskopie*. Praha: Československá akademie věd, 1958. Dostupné také z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:87461ef0-6543-11e2-bc24-005056827e51>.
- [32] SUŠKIN, Nikolaj Gavrilovič. *Elektronový mikroskop*. Vyd.1. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1954. Řada elektrotechnické literatury. Dostupné také z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:62089de0-d550-11e5-ab98-005056827e52>.
- [33] GÄRTNEROVÁ, V. a A. JÄGER. Elektronovým mikroskopem do nitra materiálů aneb jak vypadá jejich struktura. *Fyzikální ústav Akademie Věd ČR, v.i.i.* [online]. 2014 [cit. 2017-03-27]. Dostupné z: <http://www.fzu.cz/elektronovym-mikroskopem-do-nitra-materialu-aneb-jak-vypada-jejich-struktura>.
- [34] HEJTMÁNEK, Milan. *Úvod do světelné mikroskopie*. Olomouc: Univerzita Palackého, 1985. Učební texty vysokých škol.
- [35] ČÁSLAVSKÝ, Josef. Instrumentální a strukturní analýza [online]. 2016, [cit. 2017-03-27]. Dostupné z: <http://www.vutbr.cz/elearning/mod/resource/view.php?id=190564>.
- [36] *Labicom, s.r.o.: Laboratorní přístroje a příslušenství, poradenství a konzultační činnost* [online]. 2004 [cit. 29.3.2017]. Labicom. Dostupné z: <http://www.labicom.cz>.
- [37] BIELSKÁ, L. *Metody analytické extrakce perzistentních organických polutantů z pevných matric*. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2006. 69 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDR. Zdeněk Šimek, CSc.
- [38] MORRISON, George H. a Henry FREISER. *Extrakční metody v analytické chemii*. Praha: SNTL, 1962. Moderní metody v chemické laboratoři. Dostupné také z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:19d82d80-06f9-11e6-a5b6-005056827e52>.
- [39] KÁBELOVÁ, Božena, Ivana PILÁTOVÁ a Zdeňka HANÁKOVÁ. *Laboratorní technika II*. Brno: VUTUM, 1999. ISBN 80-214-1450-2.
- [40] Chemical search engine. 2008. *Chemical book* [online]. [cit. 2017-03-31]. Dostupné z: [http://www.chemicalbook.com/ProductIndex\\_EN.aspx](http://www.chemicalbook.com/ProductIndex_EN.aspx).
- [41] CHIPPERFIELD, John R. *Non-aqueous solvents*. New York: Oxford University Press, 1999. ISBN 01-985-0259-1.
- [42] NOVÁK, Josef. *Fyzikální chemie I*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1999. ISBN 80-7080-360-6.
- [43] MILOJEVIĆ, Marina. Chamomile. *Fragrantica® Inc* [online]. 1 [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: <https://www.fragrantica.com/notes/Chamomile-289.html>.
- [44] AZIMOVA, Shakhnoza S. a Anna I. GLUSHENKOVA. *Lipids, lipophilic components and essential oils from plant sources*. New York: Springer, c2012. ISBN 978-0-85729-323-7.
- [45] PACÁK, Josef. *Jak porozumět organické chemii*. Praha: Karolinum, 1997. ISBN 80-718-4261-3.
- [46] VINTER, Vladimír. *Rostliny pod mikroskopem: základy anatomie cévnatých rostlin*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2008. ISBN 978-80-244-1972-5. Dostupné také z:

<http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:4d311b50-609e-11e3-ac69-005056827e51>.

- [47] VINTER, Vladimír. *Listy*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2008. ISBN 978-80-244-2186-5.
- [48] LUX, Alexander, Milan BALÁŽ, Marie KUMMEROVÁ, Aleš SOUKUP, Olga VOTRUBOVÁ, Jun ABE, Shigenori MORITA a Thomas ROST. *Obrazový průvodce anatomii rostlin*. Praha: Academia, 2017. Živá příroda. ISBN 978-80-200-2620-0.
- [49] ZÁRUBA, Kamil. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-950-1.
- [50] MCNAIR, Harold. Introduction to GC. In: *Chromedia* [online]. USA: Virginia Tech, 2016 [cit. 2017-04-12]. Dostupné z: <http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=xqegzCsHonOvmOIIEcCzB&subNav=tlp>.
- [51] BORDAJANDI, L.R., et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography in the screening of persistent organohalogenated pollutants in environmental samples. *Journal of chromatography A*. 2008, 1186, s. 312-324.
- [52] CHUDOBA, Josef a Gustav ŠEBOR. Možnosti využití hmotnostní spektrometrie při analýze ropných vzorků. *Chemické listy*. 2008, **2008**(102), 8.
- [53] Čáslavský, J. *Analytická chemie II*. (Tandemové techniky) Brno: VUT, 15. Dubna 2017.
- [54] FAKHARI, Ali Reza, Peyman SALEHI, Rouhollah HEYDARI, Samad Nejad EBRAHIMI a Paul R. HADDAD. Hydrodistillation-headspace solvent microextraction, a new method for analysis of the essential oil components of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Chromatography A*. 2005, **1098**(1-2), 14-18. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.08.054. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967305017024>.
- [55] GAVAHIAN, Mohsen, Asgar FARAHNAKY, Reza FARHOOSH, Katayoun JAVIDNIA a Fakhri SHAHIDI. Extraction of essential oils from *Mentha piperita* using advanced techniques: Microwave versus ohmic assisted hydrodistillation. *Food and Bioprocess Processing*. 2015, 94, 50-58. DOI: 10.1016/j.fbp.2015.01.003. ISSN 09603085. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960308515000188>.
- [56] Pekař, M. *Aplikovaná koloidní chemie*. Brno: VUT, 26.4.2017.



## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

HP – Heřmánek pravý

LL – Levandule lékařská

MK – Máta kadeřavá

ML – Meduňka lékařská

SL – Šalvěj lékařská

DvP – destilace vodní parou

UE – ultrazvuková extrakce

MAE – mikrovlnná extrakce

PSE – extrakce podporována tlakem

IL – iontová kapalina

EtAc – ethylacetát

BMIMBF<sub>4</sub> – 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate

TOF – (Time of Flight) průletový analyzátor

SEM – rastrovací elektronová mikroskopie

FID – plamenový ionizační detektor

RTILs – (Room temperature ionic liquids) – kapalné iontové kapaliny

GCxGC/TOF-MS – Kompletní dvojrozměrná plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

GC/MS – Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

ÚCHTOŽP – Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí

## **8 SEZNAM PŘÍLOH**

*Příloha 1: CD s tabulkami identifikovaných chemických sloučenin získaných destilací vodní parou metodou GCxGC/TOF-MS*

*Příloha 2: CD s ukázkou chromatogramů extraktů získaných destilací vodní parou*